A foszfátéhezés, mint a stresszindukált prolinszintézis kiváltója *Arabidopsis thaliana*-ban

Ph.D. értekezés

Aleksza Dávid

Témavezetők: Dr. Szabados László; Dr. Horváth V. Gábor

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged
2018.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAAP	aminosav-auxin permeáz
ABA	abszcizinsav
APC	amoniosav-poliamin-kolin
ATF	aminosav transzporter család
ATP	adenozin-trifoszfát
ChIP	Kromatin Immunoprecipitáció
CTAB	cetil trimetilammónium bromid
DGDG	digalaktozil-diacilglicerol
EDTA	etilén-diamin tetraecetsav
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
GSA	glutamát-szemialdehid
H_2O_2	hidrogén-peroxid
LHT	lizin-hisztidin transzporter
MAP-kináz	mitogén aktivált protein kináz
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerol
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	nitrogén-monoxid
P5C	pirrolin-5-karboxilát
PRE	prolin válasz elem
ProT	prolin-transzporter
PSR	foszfátéhezési válasz
ROS	reaktiv oxigénformák
SDS-PAGE	natrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
siRNS	kis interferáló RNS
Y1H	élesztő egy-hibrid

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 2
TARTALOMJEGYZÉK 3
BEVEZETÉS 5
Az Arabidopsis thaliana, mint modellnövény 5
A környezeti stressz 5
A szabad prolin, mint stresszmetabolit 8
A prolin szintézise 9
A P5CS1 és P5CS2 gének szerepe 9
A P5C reduktáz (P5CR) 12
Lebontás 12
A prolin-dehidrogenázok (PDH1 és PDH2) 12
A P5C dehidrogenáz (P5CDH) 14
A prolin transzporterek 15
A foszfor szerepe a növényekben 15
A foszfátstressz jelátvitel és annak komponensei növényekben 17
CÉLKITŰZÉSEK 23
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 24
Növényi anyagok és nevelési körülmények 24
Molekuláris biológiai alapmódszerek 25
DNS izolálás 25
Valós idejű kvantitatív PCR (rt-qPCR) 26
Élesztő egy-hibrid rendszer (Y1H) 26
Electrophoretic mobility shift assay 28
Kromatin immunoprecipitáció 29
Prolin meghatározás 31
Lipid-peroxidáció vizsgálata 31
A hidrogén-peroxid szint meghatározása 32
A klorofilltartalom mérése 32
Fehérje izolálás, poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot 32
Mikroszkópos kísérletek 33

Bioinformatikai módszerek *33*
EREDMÉNYEK 35
A P5CS1 transzkripcióját szabályozó faktorok azonosítása élesztő egy-hibrid rendszer segítségével *35*
A kölcsönhatás in vitro és in vivo igazolása: EMSA, ChIP *38*
A prolinmennyiség változása Arabidopsis thaliana-ban foszfátéheztetés során *43*
A prolinmetabolizmusban részt vevő gének kifejeződésének vizsgálata *44*
A P5CS1 fehérje mennyiségének térbeli és időbeli változása, a gyökérnövekedés alakulása foszfátéhezés hatására *45*
A foszfátstressz élettani hatásai vad típusú növényekben *46*
A PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok szerepe a prolinfelhalmozódásban *48*
Az abszcizinsav szabályozza a prolin felhalmozódást a foszfátéhezés alatt *51*
A prolin szerepe a foszfátéhezés során *54*
Az élesztő egy-hibrid rendszerben azonosított P5CS1 promóter interaktorok *59*
MYB30 ..... *60*
Mustang-3 ..... *61*
Indetermined Domain-5 ..... *62*
BROTHER OF LUX ARRHYTHMO *62*
Phosphate Starvation Response1 és Phosphate Starvation Response-like1 ..... *63*
A P5CS1 promóter és a PHR1-PHL1 transzkripciós faktorok kötésének bizonyítása *65*
A prolinszintézis alakulása és annak háttere foszfátéhezés alatt *66*
A phr1, phl1 és phr1phl1 mutánsok prolinakkumulációja *69*
Az abszcizinsav jelátviteli út a foszfátéhezési válaszreakciókban is szerepet játszik *70*
A foszfátéhezésre adott válasz összetett fény és hormonális szabályozás alatt is áll *72*
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 76
IRODALOMJEGYZÉK 77
ÖSSZEFOGLALÁS 95
SUMMARY 99

BEVEZETÉS

Az Arabidopsis thaliana, mint modellnövény

Az *Arabidopsis thaliana*, magyar nevén lúdfű, a molekuláris növénybiológia első és a mai napig legáltalánosabb modellnövénye. Kétszikű, évelő, a keresztesvirágúak (Brassicaceae) családjába tartozó növény, ami egész Eurázsiában őshonos. Több olyan tulajdonsággal is rendelkezik, amlyek kiváló modellnövénnyé teszik: kisméretű, rövid az életciklusa (kb 60 nap), önmegporzó, könnyen keresztezhető. A magasabbrenű növények között az Arabidopsisnak van az egyik legkisebb, 135 Mb-nyi genomja, amely 5 kromoszómán helyezkedik el. Ez volt az első megszekvenált növényi genom (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). 27000 génje alternatív splice variánsokkal együtt 37000 fehérjét kódol.

Az Arabidopsis modellnövénnyé válásában nagy szerepe volt a magyar származású Rédei Györgynek (Rédei, 1975). Az ő nevéhez fűződik, a leggyakoribb vad típus, a Columbia leírása is. A genom alacsony szinten metilált, és kevés repetitív elemet tartalmaz (Meyerowitz 1992.). Az Arabidopsis genomban fizikai és kémiai ágensekkel is könnyen idézhetünk elő mutációkat. Agrobacterium- által közvetített transzformációval nagyon hatékonyan lehet transzformáns növényeket létrehozni (Bent, 2000). Többféle kísérleti rendszerben is nevelhetjük, üvegház mellett hidropónikusan, és Petri-csészében is. Általánosságban elmondható, hogy az Arabidopsis kísérletek eredményei könnyen, hatékonyan adaptálhatók más haszonnövényekben ipari célokra is.

A környezeti stressz

A növények, helyhez kötött életmódjuk miatt számtalan környezeti hatásnak vannak kitéve életük során, így igen gyakran találkoznak különböző stresszfaktorokkal. A stressz definíciója Larcher (1987) szerint a következő: "A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növénnyel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz.”

A stresszformákat többféle módon csoportosíthatjuk, ezek közül az egyik leggyakoribb a stressz eredete szerinti megkülönböztetés; ez esetben biotikus, illetve abiotikus stresszről beszélhetünk. A biotikus stressz kategóriájába tartozik a vírusok, baktériumok, gombák, illetve állatok által okozott fertőzések, illetve sebzések. Az abiotikus, vagy környezeti stresszfolyamatok lehetnek a magas vagy alacsony fény-, szárazság-, hőmérsékleti- vagy oxidatív stressz, illetve különféle tápanyaghiányok is. Ezen stresszhatások egymással összefüggésben jelentős hatást gyakorolnak a növények morfológiájára, anyagcseréjére, ezáltal meghatározzák egyes fajok optimális életkörülményeit, elterjedési területét is (Smirnoff, 1998). Az abiotikus stresszfaktorok világszerte komoly problémát okoznak a mezőgazdaságnak, így a tudománynak törekednie kell arra, hogy megismerje az egyes stresszfolyamatok részleteit és megoldásokat dolgozzon ki az általuk okozott károsodás elkerülésére. Az abiotikus stressz alatt jellemzően az alábbiakat értjük: ozmotikus stressz, sóstressz, hő-vagy hidegstressz, illetve fénystressz. Ezekben a stresszfaktorokban közös, hogy a növényekben reaktív oxigénformák kialakulását idézik elő, amelyek, alacsonyabb mennyiségben jelmolekulaként funkcionálnak, nagyobb koncentrációban viszont jelentős károsító hatással bírnak.

Az ozmotikus stressz az egyik leggyakoribb, amivel a növényeknek meg kell küzdenie, ezt a szárazság, a talaj magas sótartalma és az alacsony hőmérséklet egyaránt kiválthatja. A különböző éghajlatokon élő növények mind alkalmazkodni tudtak az élőhelyi, földrajzi viszonyokhoz azáltal, hogy olyan biokémiai és élettani stratégiákat alakítottak ki, amelyek lehetővé teszik, hogy a növény megőrizze vízpotenciálját. Az ozmotikus stressz jellemző reakcióútjai a Ca^{2+} ion által moduláltak, a jelátvitel MAP-kinázok és Ca-függő protein kinázok által alkotott foszforilációs kaszkádon keresztül érik el a célgéneket amelyeken belül megkülönböztetünk korai (DREB, ABF, SnRK, ABI1) illetve késői (RD29B, P5CS1, RAB18, stb.) kifejeződésűeket (Singh et al, 2002, Seki et al., 2003). Az ozmotikus stressz jelátvitelében fontos szerep hárul az abszcizinsav hormonra (ABA), de léteznek abszcizinsav független jelátviteli utak is (Shinozaki 2000.). Ozmotikus stressz hatására különféle védőfehérjék (LEA-k), illetve olyan metabolitok termelődnek, amelyek képesek a vízvesztés káros hatását csökkenteni (prolin, glicin-betain,mannitol) (Hare et al 1998).

A hőmérsékleti stressz esetén mindenekelőtt tisztáznunk kell, hogy az egyes növényfajok számára mi az optimális hőmérséklet. Ezt részint a növényekben lejátszódó anyagcsere folyamatok kinetikai paramétereinek hőmérséklet függése, részint a sejten belüli membránok lipidjeinek telítettségi állapota határozza meg. Azok a növények, amelyeknek az növekedési optimuma az alacsonyabb hőmérsékleti tartományokban van, a membránjaikban nagyobb arányban tartalmaznak telítetlen zsírsavakat, mint telítetteket. Fagyás esetén a jégkristályok képződése fizikai károsodást okoz a sejtekben. Annak érdekében, hogy a jégkristályok minél alacsonyabb hőmérsékleten képződjenek, a növények megemelik a sejtközi térben a cukrok koncentrációját. Hőstressz esetén a membránok mellett a fehérjék szerkezete is károsodik. A növény ez ellen transpirációs hűtéssel, illetve hősokkfehérjék termelésével válaszol. Ozmotikus stressz esetén nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségű és felvehető halmazállapotú víz (aszály, erős párolgás, erős fagy, magas sótartalmú talaj miatt) amire a növények a vízpotenciál magasan, vagy alacsonyan tartásával válaszolnak. A sóstressz kialakulhat természetes úton is a kedvezőtlen vízellátottság, illetve az egyes talajok eltérő kémiai és fizikai tulajdonságai miatt. Napjainkban egyre jelentősebb az intenzíven öntözött talajokban jelentkező sótöbblet is (Rengasamy, 2006). A talajok sótartalmának meghatározói elsősorban a Na^{2+}, Cl^{-}, Mg^{2+}, $Fe^{2+,3+}$,SO_4^{2-} ionok. A szárazság és a hőstressz esetén is jelentős szerep jut az abszcizinsav-mediált jelátviteli utaknak. A sóstressz a növényekben enzimek inaktiválásával és a fehérjeszintezis gátlásával járhat (Taiz and Zeigel, 1998) A legtöbb stresszfaktor hatására megváltozik a növényi sejtek redox állapota, ami oxidatív stresszhez, reaktív oxigénformák (ROS) megjelenéséhez vezet. Ilyen lehet a fent említetteken kívül a fény és a nehézfémstressz, de ez történik biotikus stressz - például kórokozók, vagy sebzés - következtében létrejövő hiperszenzitív reakció alatt is. Az oxidatív stressz leglátványosabban a klorofill bomlásán, növény fakulásán követhető nyomon.

A szabad prolin, mint stresszmetabolit

A növények a stresszfolyamatokra többféleképpen reagálnak. Az ilyenkor aktiválódó jelátviteli utak, a megváltozott anyagcsere következtében számos olyan gén expressziója módosul, illetve számos olyan anyagcseretermék keletkezik amelyek segítségével a növény csökkenteni próbálja a stressz okozta károsodásokat. A növényi stressz tanulmányozása során a stressz formájától függően számos metabolit felhalmozódását figyelhetjük meg, ezek közül kiemelt jelentőségű a szabad prolin akkumulációja. A prolin nagymértékű felhalmozódását számos növényben kimutatták szárazság és sóstressz által előidézett alacsony vízpotenciál esetén. Jónéhány tanulmányban említik meg a prolinfelhalmozódást más stresszformák, pl. nehézfémek, oxidatív ágensek, és bizonyos patogének esetében is (Fabro et al., 2004; Kumar and Mysore, 2012). Arabidopsis csíranövényekben a prolinkoncentráció akár több mint százszorosára is megemelkedhet alacsony vízpotenciál hatására és amint a stressz elmúlik a prolinszint néhány nap alatt visszaáll az alapállapotba. Jelentős mértékű prolinfelhalmozódást figyelhetünk meg számos más sóstressznek kitett növényben is. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a prolin minden olyan körülmény esetén felhalmozódik, amely a növény dehidratációjához vezet,, de kisebb mértékben nehézfémek és egyes patogén mikroorganizmusok is előidézhetik (Verslues et al., 2006; Sharma and Dietz, 2009; Fabro et al., 2004).

A szárazság által előidézett nagymértékű prolin felhalmozódást részben magyarázhatjuk a prolin kémiai tulajdonságaival: a prolin a leginkább vízoldékony aminosav, és a legtöbbet tölti ikerionos állapotban, vagyis gyenge pozitív és negatív töltése is van (a karboxi és aminocsoportok mentén). Ez a tulajdonsága megegyezik azokkal az anyagokkal, amelyeket kompatibilis ozmotikumként tartunk számon (glicin-betain, mannitol, trehalóz) és számos organizmusban részt vesznek az ozmolaritás szabályozásában (Yancey, 2005). *Brassica juncea* tilakoid membránon megfigyelték, hogy 1M prolin jelenlétében, az erős fény által előidézett lipid peroxidáció csökkent, amit a prolin szabadgyök kioltó képességének tulajdonítanak (Alia et al 1991.) Több növényben is (*Brassica juncea, Vigna radiata, Oryza sativa*) megfigyelték a megnövekedett prolinakkumulációt UV besugárzás hatására, ami valószínűsíti a

szabadgyökök elleni védő hatást (Saradhi et al 1995.) Hare és Cress (1997) szerint stresszkörülmények között a prolinnak jelentős szerepe van a redox egyensúly fenntartásában azzal, hogy segít a normál, stresszmentes állapotban meglévő NAD(P)H/NAD(P) arány megtartásában. A sokat tanulmányozott ozmoprotektáns funkció mellett a prolin fontos szerepet játszik számos növényi fejődési folyamatban is, mint pl. a virágzás, a pollen, az embrió és a levélfejlődés (Székely et al., 2008; Mattioli et al., 2009).

A prolintartalmat a szintézis és a degradáció egyensúlya határozza meg. Növényekben a glutamátból eredeztethető útvonal a legjelentősebb, ami két reakción kereszül zajlik. Az első lépést a Δ^1-pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS) katalizálja, ami glutamátból glutamate-szemialdehidet (GSA) szintetizál (Hu et al, 1992.,Yoshiba et al 1995., Funck et al. 2008). A GSA spontán alakul át pirrolin-5-karboxiláttá (P5C), amit a P5C reduktáz (P5CR) egy redukciós lépéssel alakít prolinná (Delauney et al. 1990., Funck et al, 2012.). Az egész folyamat sebességét az első lépés határozza meg, a ”feedback” mechanizmussal szabályozott P5CS enzim által, melyet Arabidopsisban két gén a *P5CS1* és *P5CS2* kódol (Zhang, 1995., Szabados, 2010). Egy alternatív prolin bioszintézis út az ornitinből indul ki, melynek kulcsenzime az ornitin-aminotranszferáz (oat - Delauney et al, 1993). Ennek az útvonalnak a szerepe a prolin felhalmozódásban megkérdőjelezhető, mert funkció vesztéses *oat* mutánsokban a prolin szint nem változik a vad típushoz képest (Funck et al, 2008.) .

A prolin szintézise

A P5CS1 és P5CS2 gének szerepe

A prolinszintézis elsődlegesen fontos útvonalát meghatározó Δ1-pirrolin-5-karboxilát szintáz P5CS két izoenzimjének szerepe, funkciója között jelentős különbségeket mutattak ki. A prolinszintézis (1. ábra) helye a legtöbb forrás szerint a citoplazma, bár stressz körülmények között a kloroplasztiszban is végbemehet (Székely és mtsai 2008).

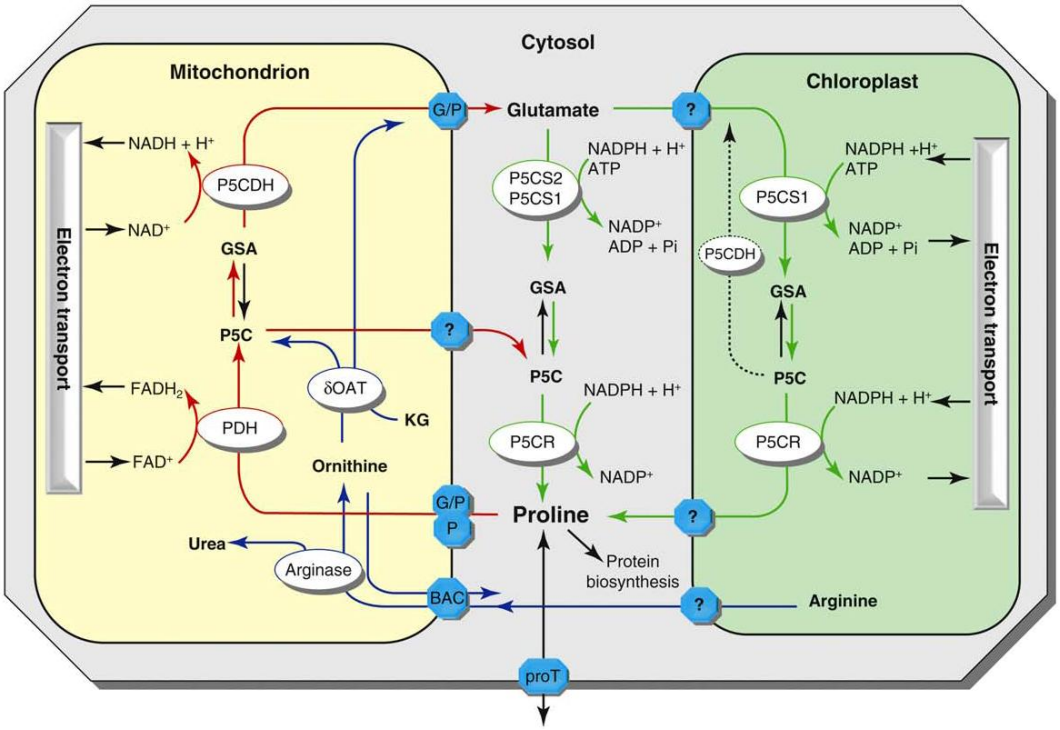
A *P5CS1* expressziója a hajtásban a legmagasabb, az osztódó szövetek kivételével, ahol alacsony szintű expresszió figyelhető meg. A *P5CS1* transzkripcióját a magas só, dehidratáció és hideg indukálja (Delauney and Verma, 1990; Yoshiba et al.,

1999; Hong et al., 2000), a P5CS1 indukciója fényfüggő (Ábrahám et al., 2003) és reaktív oxigén (ROS) szingálokra is válaszol (Ben Rejeb et al, 2015). Rövid távú dehidratációs kísérletekben a *P5CS1* indukciója és a prolin felhalmozódás hasonló tendenciát mutat (Yoshiba et al., 1995). Hosszú távú vagy más jellegű stresszfolyamatok alatt ez az összefüggés nem mindig egyértelmű (Kaplan et al., 2007). A P5CS1 funkció hiányában *p5cs1* mutánsban jóval alacsonyabb prolinszintet lehetett kimutatni só stressz és alacsony vízpotenciál esetén (Szekely et al., 2008; Sharma and Verslues, 2010). Ezekről a mutánsokról ismert az is, hogy só stressz esetén magasabb ROS felhalmozódás figyelhető meg bennük, a növekedésük visszamarad, ami fokozott a só-, és ozmotikus stressz érzékenységre utal (Nanjo et al., 1999; Szekely et al., 2008). Abszcizinsav-deficiens mutánsokkal illetve hozzáadott abszcizinsavval (ABA) végzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a só és ozmotikus stressz által aktivált prolinszintézist legalábbis részben az ABA által szabályozott folyamatok ellenőrzik (Verslues and Bray, 2006; Sharma and Verslues, 2010). A *P5CS1* expresszióját a fény (Hayashi et al., 2000), illetve NO kezelés megemeli (Zhao et al., 2009), brasszinoszteroidok hatására azonban csökken (Ábrahám et al., 2003). Az ABA és a fény (Ábrahám et al., 2003) mellett a kálcium és lipid szignálok is hatással vannak a *P5CS1* gén működésére (Knight et al, 1997; Thiery et al, 2004; Parre et al, 2007). Az ABA-án és brasszinoszteroidon kívül más növényi hormonról nem ismert, hogy szerepe van a *P5CS1* transzkripciós szabályozásában.

A *P5CS1*-gyel ellentétben a *P5CS2* egyfajta háztartási génként működik, kifejeződése az egész növényben egyenletes, és csak kismértékben vagy egyáltalán nem reagál az abiotikus stresszhatásokra (Strizhov et al., 1997; Zhang et al., 1997; Szekely et al., 2008). Ugyanakkor szerepe lehet a növény-patogén kölcsönhatásokban, mivel az avirulens patogén baktérium fertőzés esetén megemelkedik az expressziója (Fabro et al., 2004). A *P5CS2* gén aktív osztódó kalluszban és sejtszuszpenzióban is. A *p5cs2* mutánsok embrió letálisak akkor is, ha a P5CS1 funkcióképes (Szekely et al., 2008), ami arra utal, hogy a *P5CS2*-nek a növényi egyedfejlődésben fontos, jelentős szerepe van. A P5CS2 fehérje egyértelműen citoplazmában lokalizálódik, míg a P5CS1 bizonyos esetekben a kloroplasztiszokban is kimutatható (Székely et al, 2008). A P5CS1 és P5CS2 enzimek poszttranszlációs szabályozásáról keveset tudunk. Bár már írtak le

P5CS foszforilációt, ennek hatása a fehérje aktivitására nem ismert (Benschop et al., 2007; Reiland et al., 2009).

A *P5CS1* és *P5CS2* gének expressziójának részletei, a transzkripciós szabályozásukban résztvevő transzkripciós faktorok (TF) nem ismertek. A *P5CS1* promóter olyan szekvenciamotívumokat tartalmaz, melyek megtalálhatóak a rokon Brassicaceae fajokban, és kötőhelyei lehetnek bZIP, MYB,MYC, AP2/EREBP, C2H2 Zn-type transzkripciós faktoroknak (Fichman et al, 2015). Egy kromatin immunoprecipitálási (ChIP) tanulmány szerint néhány ABA-regulált TF is képes kötődni a *P5CS1* promóteréhez (Song et al, 2016).



1. ábra, A prolin metabolizmus a növényekben (Szabados és Savouré, 2010). A prolin szintézise a citoplazmában és a kloroplasztiszban zajlik, forrása a glutamát, kulcsenzime pedig a P5CS1. A prolin, szintézise után a citoplazmába kerül, majd szükség esetén a prolin transzporterek segítségével a felhasználási helyére szállítódik. Lebontására a mitokondriumban kerül sor a prolin-dehidrogenázok által.

A P5C reduktáz (P5CR)

A ∆-1-pirrolin-5-karboxilát-reduktáz P5CR enzimet, az Arabidopsisban egyetlen gén kódolja és a P5C-t alakítja át prolinná. Az általános vélekedés szerint a P5CR nem mennyiségi meghatározója a prolinszintézisnek. A P5CR transzkripció szabályozása sokkal inkább a növény egyedfejlődéséhez, semmint stresszhatásokhoz köthető (Verbruggen et al., 1993; Hua et al., 1997; Sharma and Verslues, 2010) habár kimutatták, hogy a meleg és a sóstressz is indukáló hatással van a gén kifejeződésére (Hua et al 1997) (Verbruggen et al., 1993; Hua et al., 1997; Sharma and Verslues, 2010). A magas szinten kifejeztetett P5CR nincs hatással a képződő prolin mennyiségére (Szőke et al., 1992).. Érdekes, hogy a megnövekedett transzkripció nincs hatással sem a szabad prolin szintre, sem pedig az enzim aktivitására. A szabályozást tekintve fontos szerepe van egy 92 bp hosszú, az 5' nem transzlálódó régióban (UTR-ben) található szekvenciának, ami mintegy regulátorként viselkedve szabályozza az mRNS stabilitását illetve gátolja a transzlációt hő és sóstressz alatt, vagyis a gén traszkripciós szintje független a keletkező fehérje szintjétől (Hua és mtsai 2001). Ezen a poszttranszkripciós szabályozáson kívül a P5CR szintje függ a növény fejlődési állapotától is, a gén legmagasabb szinten a gyökércsúcsban, a hajtásmerisztémában, a segítősejtekben, a hydatodákban, a pollenszemekben, a ovulumban, és a fejlődő magokban expresszál (Szőke et al., 1992; Hua et al., 1997).

Lebontás

A prolin lebontása egy oxidációs folyamat, amit a prolin-dehidrogenáz (PDH) és a ∆-1-pirrolin-5-karboxilát-dehidrogenáz (P5CDH) szabályoz. Mindkettő a mitokondriumban helyezkedik el és kettő illetve egy gén kódolja őket.

A prolin-dehidrogenázok (PDH1 és PDH2)

A prolin dehidrogenáz vagy prolin oxidáz a prolin lebontási útvonalának első lépése, a prolin P5C-vé történő átalakulását katalizálja a mitokondriumban. A PDH enzim

kinetikájáról, poszttranszlációs szabályozásáról meglepően keveset tudunk. A PDH valószínűleg részt vesz a mitokondriális elektrontranszportláncban és az ATP szintézisben is. A PDH utáni elsőgleges elektron-akceptorról nincsenek közvetlen bizonyítékaink, de az ismert adatok alapján ez valószínűleg a FAD lehet (Lee et al 2003.). A *PDH* expressziója csökken alacsony vízpotenciál, dehidratáció és sósrtessz alatt. (Kiyosue et al., 1996; Verbruggen et al., 1996; Verslues et al., 2007), ugyanakor serkentőleg hat rá a stressz elmúlása, illetve a hozzáadott prolin is. (Peng et al., 1996; Yoshiba et al., 1997; Satoh et al., 2002). A *ProDH* expressziójának szabályozása kulcsfontosságú a stresszindukált prolinfelhalmozódás során: míg a stressz folyamatok gátolják, a felhalmozódó prolin már indukálja a *ProDH* kifejeződését (Kaplan et al., 2007). A *PDH* antiszensz szuppresszálása megnövekedett prolinszinthez és stressztoleranciához vezetett. (Nanjo et al., 1999).

Arabidopsisban a P5CS1-hez hasonlóan a PDH-nak is két izoenzimje ismert (Funck et al., 2010). A *PDH2* általánosságban kevésbé expresszál, mint a *PDH1* és a stressz is kevésbé hat rá (Sharma and Verslues, 2010). Szintén indukálható azonban hozzáadott prolinnal, illetve gátolható külsőleg hozzáadott cukorral is (Hanson et al., 2008; Sharma and Verslues, 2010). A ProDH1-hez hasonlóan itt sem rendelkezünk információkkal a fehérjeszintekről illetve az enzim tulajdonságairól.

Mindkét *PDH* génnek egyedülálló transzkripcionális mintázata van. A *PDH1* promóterének analízise vezetett egy cisz-ható, prolin-válasz szekvencia elem (ACTCAT, Proline Response Element, PRE) azonosításához (Satoh et al., 2002). Később bebizonyosodott, hogy a PRE-n keresztül a *PDH* gént bZIP típusú transzkripciós faktorok indukálják. Az AtbZIP11 és AtbZIP53 faktorok az ATB2 alcsalád tagjai (Satoh et al., 2004). AtbZIP11-ről ismert, hogy a cukor jelátviteli útban szabályozza a *PDH2* kifejeződését, míg a túltermeltetett bZIP11 mind a *PDH1* és *PDH2* kifejeződését indukálja, ami csökkenő prolinszinthez vezet (Hanson et al., 2008). Kissé ellenmondásos ugyan, hogy a szárazság- vagy sóstressz által megemelt prolinszint nem indukálja a *PDH*-t, a külsőleg hozzáadott viszont igen. Ezért olyan eddig még nem ismert jelátviteli mechanizmusok felelhetnek, melyeknek az a funkciója, hogy stressz alatt a magas prolinszint ellenére is blokkolják az expressziót, annak elmúltával azonban ez a gátlás megszűnjön. Ez a mechanizmus nem ABA függő (Sharma and Verslues, 2010).

A P5C dehidrogenáz (P5CDH)

A Δ-1-pirrolin-5-karboxilát dehidrogenáz enzim katalizálja a prolin oxidációjának második lépését ami a P5C glutamáttá történő alakítását végzi. Arabidopsisban egyetlen gén kódolja a P5CDH-t, és a protein a mitokondriumban lokalizálódik. (Deuschle et al., 2001). A P5CDH élettani funkcióira nagyrészt a *p5cdh* mutáns vizsgálatából következtethetünk. Ezekben a mutánsokban stressz alatt a vad típussal megegyező, vagy csak kissé megnövekedett prolinszintet találunk. (Deuschle et al., 2004; Borsani et al., 2005). A *p5cdh* mutánsokra jellemző, hogy magasabb prolinszintet tartanak fenn kontroll körülmények között, mint a vad típus. Prolin, arginin, vagy ornitin jelenlétében a *p5cdh* mutáns fokozott ROS akkumulációt mutat ami szövetkárosodással jár. (Deuschle et al., 2004). A károsodás elsődlegesen a megnövekedett P5C-nek lehet köszönhető, ami megnövelheti a ROS termelést a mitokondriumban. A *P5CDH* transzkripcióját környezeti szignálok és az egyedfejlődés egyaránt befolyásolják. Egy alap szinten a *P5CDH* expressziója minden növényi részben megfigyelhető, egyedül a virág a kivétel, ahol az expressziós szint magasabb (Deuschle et al., 2001). A *P5CDH* kifejeződését alacsony vízpotenciál és hozzáadott prolin megemeli, ugyanakkor sóstressz alatt siRNS-ek gátolják. Ezek az siRNS-ek a *SRO5* és a *P5CDH* gének só stressz során termelődő átfedő transzkriptjai révén keletkeznek (Borsani et al., 2005). Összességében a sóstressz hatására a prolinszintben bekövetkező különbségek valószínűleg szoros kapcsolatban állnak a keletkző reaktív oxigénformákkal, míg az alacsony vízpotenciál, annak ozmotikus tulajdonságai és redox-puffer kapacitása miatt, valószínűleg közvetlenül indukálja a prolinszintézist (Sharma and Verslues, 2010).

A prolin transzporterek

A prolin transzporterek szabályozzák a prolin felvételét a plazmamembránon át. Három csoportba tartozhatnak, amelyek az aminosav transzporter (ATF), aminosav-auxin permeáz (AAAP) és az aminosav-poliamin-kolin (APC) családokba tartoznak (Rentsch et al., 2007). Az ATF/AAP permeáz családon belül a prolint felismerő transzporterek több alcsaládba is tartoznak, pl. az aminosav-permeáz (AAP), a lizin-hisztidin transzporter (LHT), és a prolin transzporter (ProT) alcsaládok. Az AAP-k szabályozzák a glutamát (aszparaginsav) és a semleges aminosavak, köztük a prolin protonokkal társított felvételét (Frommer et al., 1993; Fischer et al., 1995, 2002). Az egyes AAP-k affinitása a prolinra különbözik. Az LHT-k nagy affinitással transzportálnak semleges aminosavakat, így prolint is (Chen and Bush, 1997; Lee and Tegeder, 2004; Hirner et al., 2006). Az AAP-ről és LHT-ről elmondható, hogy ugyanolyan affinitással rendelkeznek a prolin felé, mint más aminosavak felé. A ProT-k esetében ez nem így van, ezek a prolinon kívül más aminosav transzportjában nem vesznek részt (Rentsch et al., 1996).

A foszfor szerepe a növényekben

A foszfor alapvető építőköve számos molekulának, foszfolipideknek, nukleinsavaknak, ATP-nek és jelentős szerepet tölt be a fehérjék visszafordítható módosításában is. Az oldott foszfátformák az oldhatatlanokhoz képest meglehetősen korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre a talajban. Ezek fémekkel alkotott komplexekben, vagy egyes mikroorganizmusok által előállított szerves vegyületekben kötött formákban találhatók, amiket a növények nem vagy csak nehezen tudnak felvenni. Napjainkban a foszfáthiány a megművelt földterületek 70%-át érinti, és jelentős mértékben csökkenti a terméshozamot, ezért a foszfátműtrágyák a modern mezőgazdaság elkerülhetetlen kiegészítőivé váltak (Lynch et al, 2011; Herrera-Estrella et al 2016.). A foszfáthiány összetett stresszt jelent a növények számára, ami gátolja a hajtás növekedését, és a gyökér megnyúlását, gátolja a főgyökér növekedését, ugyanakkor elősegíti az oldalgyökerek és gyökészőrök fejlődését, ezzel próbálja

méginkább elérhetővé tenni a talajban lévő foszfátot. A növények magas és alacsony affinitású foszfáttranszporterekkel szervetlen ortofoszfát formában képesek a foszfátot felvenni a talajból. A foszfátfelvétel hatásfoka nagyban függ a gyökérrendszer szerkezetétől, szerves savak kibocsátásától, és a talajban található mikrobáktól, főként az arbuszkuláris mikorrhizás gombáktól (Lopez-Arredondo et al 2014). A gyökérrendszerben a morfológiai változásokon túl a mikorrhizás gombákkal való szimbiotikus kapcsolatok kialakulása elősegítheti nagyobb talajfelület elérését, valamint olyan kémiai reakciók létrejöttét is, amelyek növelik a szabad foszfát hozzáférhetőségét inszolubilis (nem oldott állapotú) sókból, illetve szerves vegyületekből (McCully et al, 1999; Raghothama et al, 1999).

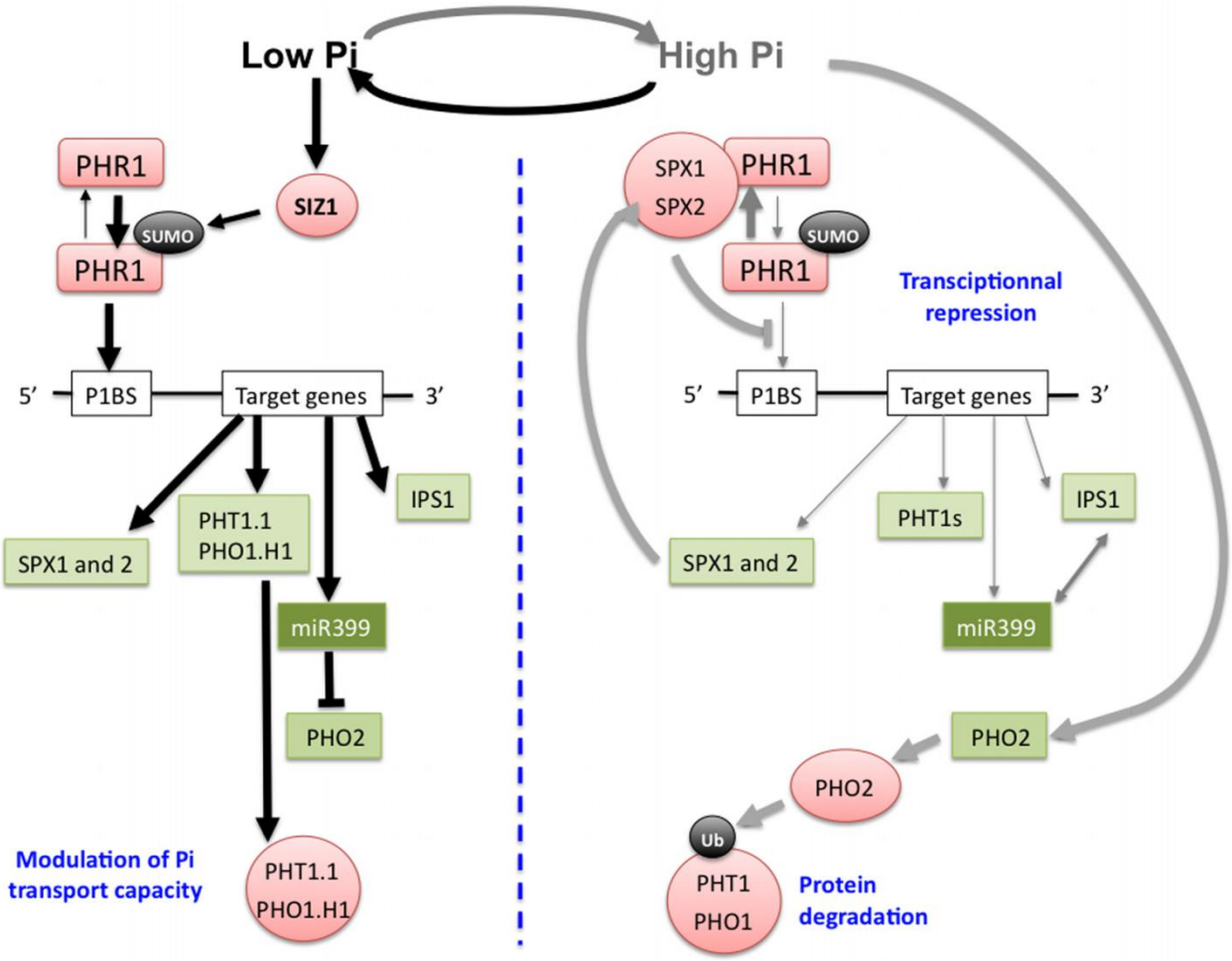
A növények által felvett foszfát jelentős része membránalkotóként foszfolipidek formájában hasznosul, ez alól kivételt képez a kloroplasztisz membránja, amely elsősorban galaktolipidekből, monogalaktozil-diacilglicerolból (MGDG) és digalaktozil-diacilglicerolból (DGDG) áll (Dörmann et al., 1999; Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2007). Foszfátéhezés alatt az MGDG és DGDG szintáz gének expressziója indukálódik és DGDG termelődik, hogy helyettesítse a foszfolipideket a növényi membránokban, ezzel takarékoskodván a rendelkezésre álló foszfáttal (Härtel et al., 2000; Kobayashi et al., 2009; Shimojima and Ohta, 2011). A foszfátéhezésnek többféle élettani következménye van, a növények megváltozott glikolízissel, mitokondriális elektrontranszporttal, szerves savak és foszfatázok kibocsátásával (Johnson et al., 1996; Bariola et al., 1994) és a foszfát transzportjáért és újrahasznosításáért felelős enzimek szintézisének megnövekedésével válaszolnak a foszfát hiányára (Lejay et al., 2008). Foszfát éhezés esetén megemelkedik a nagy affinitású foszfát-transzporterek, a szabad foszfát kötő fehérjék és a sejten kívüli foszfátformák elérhetőségét érzékelő foszfát szenzor protein kinázok expressziós szintje (Torriani-Gorini et al, 1994). Foszfát hiány esetében, más abiotikus stresszfolyamatokhoz hasonlóan a hajtásban a növekedés gátlása mellett antocianin felhalmozódás és a levelek fakulása figyelhető meg (Plaxton et al 2011). Foszfátéheztetett Arabidopsis növények metabolomikai vizsgálatakor jelentős változást tapasztaltak számos elsődleges és másodlagos anyagcseretermék, pl néhány szerves sav, cukrok, glükozinolátok, flavonoidok, aminosavak és a prolin szintjében is (Morcuende et al 2007;Valentinuzzi et al, 2015; Pant et al, 2015).

A foszfátéheztetés molekuláris következményeit először baktérium, (*Escherichia coli)* és élesztő (*Saccharomyces cerevisiae)* sejtekben írták le. Ezekben az organizmusokban egy több génből álló ún, “menekülési útvonalat” fedeztek fel, amit *pho-regulon*nak nevezték. Magasabbrendű növényekben számos, a foszfát éhezéssel kapcsolatba hozható faktort írtak le (Goldstein et al., 1988), köztük a foszfoenol-piruvát foszfatázt, a foszfát függő foszfofruktokinázt (Theodorou and Plaxton, 1993), foszfodiészterázokat, ribonukleázokat (Green, 1994), foszfát transzportereket (Raghothama, 2000), és foszfátéhezés által indukálható savas foszfatázokat (Duff et al., 1994; del Pozo et al., 1999; Baldwin et al., 2001). A foszfát homeosztázis szabályozásához egy összetett jelátviteli hálózatra van szükség, amely koordinálni tudja a felvételt, transzportot és metabolizmust is (Doerner et al 2008; Hu et al, 2011 Rouached et al, 2010). Expressziós vizsgálatok lehetővé tették számos foszfátfüggő gén, és a legfontosabb szabályozó rendszerek azonosítását (Morcuende et al., 2007; Bustos et al., 2010; Woo et al., 2012).

A foszfátstressz jelátvitel és annak komponensei növényekben

A növényekben a foszfáthiány által kiváltott stressz még kevésbé tanulmányozott, mint a só vagy szárazságstressz. A foszfát éhezés során aktiválódó reakcióutak résztvevői közül néhányat azonban már ismerünk. Ezek között jelentős szerepet játszik a PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) és PHR1-LIKE 1 (PHL1) transzkripciós faktorok, amelyek egy 15 tagú MYB-CC transzkripciós faktor család tagjai, és amelyek foszfátéhezés során a legfontosabb transzkripciós regulátornak bizonyultak. Expressziójuk foszfátéhezésre nem idukálódik ugyanakkor a *PHR1* alapaktivitása fényben jelentősen nagyobbnak bizonyult fényben, mint sötétben (Liu et al 2017.). Az említett transzkripciós faktorok számos, a foszfátéhezésben szerepet játszó gén expresszióját befolyásolják, mintegy mesterregulátorai a folyamatnak: meghatározzák a stressz során bekövetkező anyagcsere-és növekedési válaszokat (Rubio et al., 2001; Bari et al., 2006 Nilsson et al., 2007; Pant et al., 2015). A PHR1 bizonyítottan kulcsfontosságú a fénystressz során és a fotoszintézis foszfát hiány alatti fenntartásához (Nilsson et al., 2012.). A *PHR* és *PHL1* gének közt funkcionális redundancia figyelhető

meg, mivel a *phr1* mutáció hatása csak részlegesen változtatja meg több foszfátéhezéssel kapcsolatba hozható gén kifejeződését. Több bHLH, WRKY, Cink-ujj, és R2R3 MYB családba tartozó transzkripciós faktorról is feltételezhető, hogy részt vesz a foszfátéhezésre adott válaszokban, de a jelátviteli útban betöltött pontos szerepük még nem teljesen ismert. Klecker és mtsai (2014) bebizonyították, hogy a PHR1 transzkripciós faktornak a hypoxiára adott transzkripciós válaszok szabályozásában is szerepe van. A PHR1 kulcsszerepet tölt be a foszfát hiány során az aminosavak szintézise és a lipid remodeling szabályozásában (Pant et al., 2015a; Pant et al., 2015b). A foszfátéhezésben szerepet játszó gének promóterében PHR1-kötő szekvencia elem (P1BS) található, amely a PHR1 és PHL1 kötéséért felelős. P1BS nélkül nem következik be a PHR1 függő gének indukciója a foszfátéhezés alatt (Bari et al., 2006., Karthikeyan et al., 2009; Wada et al., 2015). A PHR1 és PHL1 gének expresszióját a foszfát éhezés nem változtatja meg, szerepük azobna elengedhetetlen a streszválaszban szerepet játszó gének bekapcsolásához. (Bustos et al., 2010). Ezt az elméletet erősíti meg az is, hogy *phr1* knockout mutáns növényekben a foszfát-stressz által indukált gének alacsonyabb indukciója figyelhető meg (Rubio et al., 2001; Gaude et al., 2008). Más stresszkörülményekhez hasonlóan, a foszfátstressz esetén sem csupán transzkripciós faktorok játszanak szerepet, hanem poszt-transzkripciós módosítások is jelentősek lehetnek, mint amilyen a szumoiláció vagy a proteoszómákon keresztül történő fehérje lebontási folyamatok is.



2. ábra, A foszftáfüggő PHR1-PHO2–miRNA399 kaszkád működése Arabidopsisban. Ha nem áll rendelkezésre elegendő foszfát, a PHR1 szumoilációt követően aktiválódik és a célgének P1BS helyeire bekötődve serkenti azok transzkripcióját, illetve a miR399-en keresztül blokkolja az útvonal lefolyását gátló PHO2 ubiquitin ligázt. Foszfát jelenlétében a PHR1 nem tud aktív állapotba kerülni, és a kihasználatlan foszfát transzporterek degradációra kerülnek (Briat el at 2015.).

Miura és mtsai (2005) kimutatták, hogy foszfát limitáció alatt a PHR1 transzkripciós faktor poszt-transzlációs módosításon keresztül aktiválódik, kötődik a célgénekben található P1BS szekvenciához, ami a transzkripció indukciójához vezet (2. ábra). Ez a poszt-transzlációs módosulás egy szumoiláció, amit a SIZ1 small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligáz végez. Bár a SIZ1 a *pho* regulon más tagjait is képes befolyásolni, legfontosabbnak a PHR1 aktiváló szerepét tartják (Miura et al 2005.).

A foszfátéhezés során egy fontos célgén az *SPX1* (SPX-domain gene 1 - *AT5G20150*), amely a baktériumokban leírt SPX domént tartalmazza. A foszfátéhezésre

ennek a génnek az expressziója válaszol az egyik leggyorsabban. A mezofil levélsejtekben megfigyelt sejtmagi lokalizáció arra utal, hogy szerepe lehet további foszfátéheztetésre reagáló gének transzkripciós szabályozásában (Duan et al., 2008).
SPX1 túltermelő vonalakban megfigyelték az *ACP5*, *RNS1* és a *PAP2* megnövekedett expresszióját is. Az *RNS1* egy S-típusú ribonukleáz, az *ACP5* pedig egy savas foszfatázt kódol, mindkettőnek a foszfát újrahasznosításában van szerepe, míg a *PAP2* egy antocianin akkumulációt serkentő gén. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az SPX1 a foszfátéhezés során mind az újrahasznosítás serkentésével, mind az antocianin akkumulációján keresztül a reaktív oxigén formák semlegesítésével járul hozzá a károsodások elkerüléséhez, csökkentéséhez. Megfelelő foszfátellátottság esetén azonban az SPX1-nek egészen más szerepe van, ekkor a PHR1 inhibitoraként viselkedik. Ezt kétféleképpen teheti meg: egyrészt kompetitíven kötődik a P1BS helyhez, másrészt pedig megfelelő foszfát ellátottság esetén a sejtmagban a PHR1-hez kapcsolódva megakadályozza annak kötődését a célgének promoteréhez. Ezt a modellt alátámasztja, hogy *spx1* mutáns növényekben megemelkedett PHR1 aktivitásra utaló élettani változásokat írtak le normál foszfátellátottság, illetve a foszfátstressz megszűnése esetén (Puga és mtsai 2014).

A foszfátéhezés során a PHR1 és PHL1 által szabályozott gének közül a legfontosabbak a *PHT1* és a *PHO1* gének. A *PHT1* egy plazmamembránon található nagy affinitású H^+/Pi ko-transzportert kódol (Okumura et al.,1998; Mudge et al., 2002), amely elsősorban a gyökér bőrszöveti (epidermisz) és kérgi (kortex) sejtekben található; ennélfogva a közvetlen foszfátfelvételben játszik szerepet. Amikor a foszfát bejut a gyökérbe, a szállító-xylem sejtekbe töltődik és a hajtás felé szállítódik. Ebben fontos szerepe van a periciklusban expresszálódó PHO1 transzporternek. A *PHO1* expressziója nem csak PHR-függő, de azt egy WRKY transzkripciós faktor is szabályozza (Chen et al., 2009). Amikor megfelelő mennyiségű Pi áll rendelkezésre a WRKY6 a PHO1 promóteréhez kapcsolódik és gátolja annak kifejeződését. A foszfát éhezés a 26S proteoszóma által közvetített proteolízis segítségével csökkenti a WRKY6 mennyiségét, ezáltal feloldja a transzkripciós gátlást. (Chen et al., 2009).
A PHT1 és PHO1 fehérjék poszt-transzlációs szabályozás alatt is állnak. A PHT1 fehérje, ha elegendő foszfát áll rendelkezésre, a Ser514 pozícióban foszforilálódik, így az ER-ban

marad, vagyis nem tudja elfoglalni rendeltetési helyét a plazmamembránon. (Bayle et al., 2011). Az ER-t elhagyva ennek a két transzporternek a további sorsában jelentős szerepe van a PHO2-nek, amely egy E3 típusú ubiquitin ligáz. Amennyiben megfelelő mennyiségú foszfát áll rendelkezésre, úgy a PHT1 és a PHO1 fehérjéket a PHO2 ubiquitinálja, ami után a proteoszómákban degradálódnak. A *pho2* mutánsban magas Pi –t figyelhetünk meg a hajtásban és így ez a növény a Pi mérgezés tüneteit mutatja. (Delhaize and Randall, 1995; Dong et al., 1998). Foszfáthiány esetén a PHO2 szintjét a miR399 mikro RNS is szabályozza. A miR399 expressziója a PHR1 és PHL1 aktivitásának következében a foszfátéhezéskor ugrásszerűen megnő, ami csökkenti a PHO2 transzkript szintet (Fujii et al 2005., Aung et al 2006). A miR399 RNS detektálható Pi éheztetett növényekben, de normál Pi ellátottság mellett a transzkript nincs jelen. QRT-PCR adatok szerint a miR399 transzkript foszfátmegvonás alatt 1000-10000x emelkedést mutat, ami hasonló az Arabidopsisban a foszfátéhezésre legjobban reagáló gének transzkript szint növekedéséhez. A miR399 abundanciája specifikusan Pi éhezéshez kötött, sem nitrogén-, szénhidrát- vagy kénhiány nem befolyásolja. A miR399 mellett az IPS1 (Rubio et al 2001) szintén egy PHR1 által indukált nemkódoló RNS-t kódoló gén, amelynek poszttranszkripciós szabályozó folyamatokban van szerepe az “RNS-mimikri” mechanizmusán keresztül.

A PHO2 előtti 1.1 kb hosszú 5’ UTR szakasz öt közel azonos kb. 21 nukleotid méretű motívumot tartalmaz, amely a miR399 szekvenciák komplementere, (miR399a-f variánsok). Korábbi tanulmányok szerint az miR399 által irányított mRNS degradációjának a PHO2 az egyik célpontja (Allen et al., 2005), a miR399 b, c és f túltermelése csökkent PHO2 transzkriptmennyiséghez és megnövekedett foszfát szinthez vezet (Chiou et al., 2006). Ennek megfelelően a transzgenikus miR399 túltermelő vonalak a *pho2* mutánshoz hasonló fenotípust mutattak (Bari et al., 2006). Az expressziós eredményekből és a miR399-PHO2 ellenirányú változásból arra következtethetünk, hogy a hajtásban keletkezett miR399 a gyökérbe transzportálódik, ahol a PHO2 kifejeződését gátolja (Lin et al., 2008b; Pant et al., 2008). A Pi hiány okozta miR399 expresszió növekedés a hajtásban korábban következik be, ami valószínűsíti hogy a miR399 hajtás-gyökér irányú transzportja egy rendszerszintű Pi hiány jelként is szolgál (Lin et al., 2008).

A növények az alacsony foszfátellátottság káros hatásainak kivédése érdekében elsőként foszfátfelvételhez szükséges fehérjéket kódoló géneket aktiválnak, ilyenek például a *PHT1* és a *PHO1* transzporterek. A gén aktiválását megelőzi a PHR1 szumoilációja (SIZ1 által), ami feltétele a promóterükhöz kötődésének. Ezzel egyidőben a PHT1 és a PHO1 poszttranszkripciós szabályozói (PHT1.1, PHO1.H1) is aktiválódnak, ugyanakkor gátlódnak azok a mechanizmusok, amelyek ezen fehérjék degradációját szabályozzák. Ilyen az említett fehérjék proetaszómák általi degradációjáért felelős PHO2 ubiquitin konjugáz, amelynek gátlása miR399 mikro RNS-eken keresztül történik. Amennyiben elegendő foszfát van jelen, már nem lesz szükség a megnövekedett számú foszfát-transzporterre, így ezek lebontásra kerülnek. Ilyenkor a PHR1 fehérjével SPX proteinek hatnak kölcsön, ami megakadályozza ezen transzkripciós faktor célgének promóteréhez történő kapcsolódását. Az IPS1 terméke (nem kódoló RNS) nagy mennyisében jelenik meg, megköti a miR399 RNS-eket, ezáltal azok nem tudják tovább gátolni a PHO2-t, ami a PHT1 és PHO1 degradációjához vezet.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az *Arabidopsis thaliana P5CS1* gén kifejeződését szabályozó fehérjék azonosítását tűztem ki célul. Ez a gén kódolja a stresszindukált prolin bioszintézis kulcsenzimét, mely fontos szerepet tölt be a növény védekező mechanizmusaiban, többek között só-, és ozmotikus stressz esetén is. A növények reakciói a különböző környezeti stresszformákra és az ezeket szabályozó jelátviteli folyamatok összetett transzkripciós, hormonális és metabolikus szabályozás alatt állnak.

1, Élesztő egy-hibrid rendszerrel lehetséges *P5CS1* promóter kölcsönható partnereket kutatunk fel, majd a kölcsönhatást független módszerekkel igazoljuk;
2, A kölcsönható transzkripciós faktor ismeretében vizsgáljuk a vad típusú *Arabidopsis*ban végbemenő növekedésbeli és metabolikus változásokat;
3, Felderítjük az emögött álló molekuláris mechanizmusokat és kölcsönhatásokat;
4, Amennyiben lehetséges, mutáns vonalakon teszteljük a *P5CS1* és a jelölt kölcsönható kapcsolatát;
5, Az újonnan azonosított kölcsönható partnerrel bővítjük a *P5CS1* stresszben betöltött szerepével kapcsolatos ismereteinket.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi anyagok és nevelési körülmények

A munkám során vizsgált Arabidopsis növények közül kontrolként minden esetben a Columbia ökotípust (Col-0) használtam, a mutánsok mindegyike ebben a háttérben található.A *p5cs1-1, pdh2-2* and *pdh1-4* mutánsok a SALK kollekcióból származnak (SALK_058000, SALK_108179, SALK_119334 - Székely et al, 2008). A *phr1*, *phl1* and *phr1phl1* mutánsokat Dr. J. Paz-Ares bocsátotta rendelkezésünkre (Centro Nacional de Biotecnologica, Madrid, Spain - Bustos, 2010.). Az *aba2-3, abi4-1 and abi5-1* vonalak az ABRC gyűjteményből származnak (ABRC gyűjtemény számok: CS3834, CS8104, CS8105). A növények folyamatos, 150 µE erősségű fényben 22˚C-ban vízszintes Petri-csészékben nőttek, kivéve a gyökérnövekedés vizsgálatokat, ahol a Petri-csészéket függőlegesen rögzítettük. A magokat 70%-os etanollal 1 percig, majd 10%-os Domestossal 10 percig sterilizáltuk, majd desztillált vízzel öblítettük. Az általunk használt táptalaj a következő elemekből állt: 5 mM KNO_3, 2.5 mM KH_2PO_4 (pH 5.5, KOH-dal beállítva), 2 mM $MgSO_4$, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 50 µM Fe-EDTA, 70 µM H_3BO_3, 14 µM $MnCl_2$, 0.5 µM $CuSO_4$, 1 µM $ZnSO_4$, 0.2 µM $NaMoO_4$, 10 µM NaCl, 0.01 µM $CoCl_2$, 2.5 mM MES [2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid]-KOH (pH 5.5), 0.5% (w/v) szaharóz. Az alap, kontrol (Pi+) táptalaj 2.5 mM KH_2PO_4–ot tartalmazott, a foszfátmentesből (Pi-) ezt elhagytuk (Ticconi et al, 2001.). A táptalaj szilárdításáért 0.8% phytoagar felelt. A foszfátéhezéshez 5 napig foszfor tartalmú (Pi+) táptalajon nevelt növényket helyeztünk át foszfor mentes (Pi-) vagy kontrollként Pi+ táptalajokra 14 napos időtartamra. A NaCl és abszcizinsav kezeléshez 14 napos növényeket helyeztünk át 75 és 150mM NaCl-ot, illetve 50 µM ABA-t tartalmazó táptalajokra 1-3 napra. Minden bemutatott eredmény legalább 6 technikai és 3 biológiai ismétlés után került ismertetésre, a statisztikához minden esetben standard hibát ábrázoltunk és a szignifikanciát Student-féle t-teszttel számoltuk.

Molekuláris biológiai alapmódszerek

Munkánk során a rutin klónozási és plazmidfelszaporítási eljárásokhoz *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' sejteket (Stratagene), bakteriális fehérjeexpresszióra minden esetben BL21 DE3 Rosetta (Novagene) sejteket használtunk Mindkét esetben Inoue és munkatársai által leírt módszert alkalmaztuk (Inoue et al., 1990) kompetens sejtek készítésére és transzformációjára hősokk felhasználásával.

E. coli sejtek növesztése LB táptalajon történt Sambrook et al., (1989) útmutatásai alapján 37°C-on. Az egyes használt vektoroknak megfelelően a következő koncentrációban használtunk antibiotikumokat: Carbenicillin 100 mg/l, Kanamicin 25 mg/l. A plazmid DNS izolálásához Biobasic EZ-10 Spin Column Kitet, agaróz gélen (termék mérettől függően 0.5-2%) történő megfuttatásukhoz Generuler létrát (Fermentas SM0331) használtunk Sambrook et al (1989) alapján.

A kísérletek során a plazmid DNS-ek, restrikciós endonukleáz emésztését, a DNS fragmentek ligálását minden esetben a gyártó (Thermo Fisher Scientific) által ajánlott körülmények között hajtottuk végre. Futtatás után a DNS fragmentek agaróz gélből való izolálására GeneJET™ (Fermentas, K0691) gélextrakciós kitet használtunk.

DNS izolálás

100-200 mg növényi mintát dörzsmozsárban kvarchomokkal és folyékony nitrogénnel eldörzsöltünk, majd 700 µl 65˚C-os CTAB pufferrel homogenizáltuk (2 % CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl pH:8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 1 % PVP-40 (w/v)), melyhez felhasználás előtt ml-enként 3µl β-merkaptoetanolt adtunk. Az elegyből a lipideket és proteineket 2x1 térfogatnyi kloroformmal történő extrahálással eltávolítottuk, a vizes fázisban található DNS-t izopropanollal -20˚C-on kicsaptuk, centrifugáltuk, majd 20 µl/ml RN-áz A-t tartalmazó vízben feloldjuk. A tisztább DNS elérése érdekében etídium bromidot (0.25 mg/ml végkoncentrációig) majd 5 perc sötétben történő inkubálás után ammónium acetátot (2.5 M végkoncentrációig) adunk hozzá. A szennyeződéseket fenol-kloroformos (1:1) majd kloroformos extrakcióval távolíjuk el, majd a vizes fázisban lévő DNS-t abszolút etanollal kicsaptuk, majd desztillált vízben visszaoldottuk.

Valós idejű kvantitatív PCR (rt-qPCR)

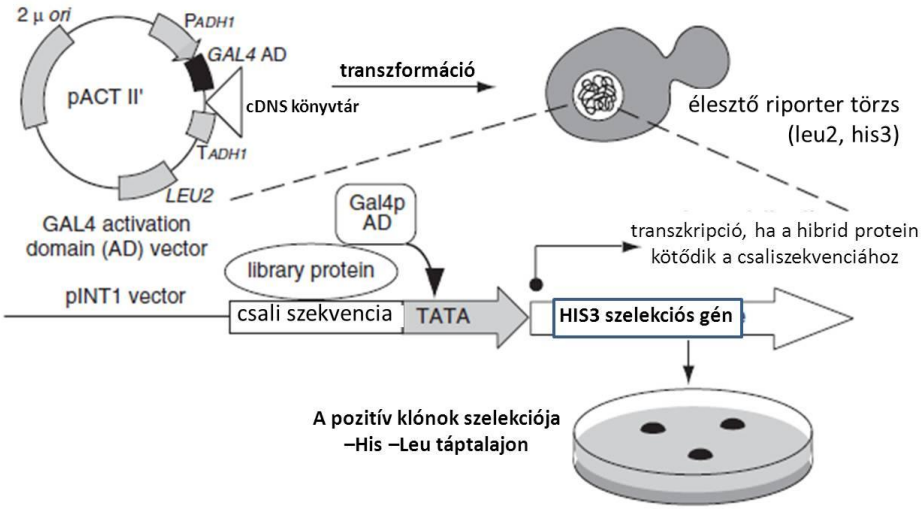
A RNS izolálást a Gombos és mtsai által jegyzett protocol szerint végeztem. A cDNS szintézisét 2 µg RNS-ból 20 µl végtérfogatban RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) enzimmel random hexamer felhasználásával végeztem. A valós idejű (real time)PCR-eket ABI 7900 Fast Real Time System (Applied Biosystems) készülékkel végeztem a következő beállításokkal: denaturáció 95°C 10 perc, 40 ciklus: 95°C 10 másodperc és 60°C 60 másodperc. A reakció végén az adatokat ABI SDS szofverrel elemeztem. A kiértékelés során a transzkript adatok meghatározásához a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert követtem (Livak et al, 2001.). A prolin metabolizmusban szerepet játszó gének közül a következők expresszióját vizsgáltam:: *P5CS1 (AT2G39800), P5CS2 (AT3G55610), P5CR (AT5G14800), P5CDH (AT5G62530), ProDH1 (AT3G30775), ProDH2 (AT5G38710).* A foszfátéhezés és a szeneszcencia kapcsolatát a *MT1A (AT1G07600), GSR2 (AT1G66200), SAG12 (AT5G45890)* gének expresszióján keresztül tanulmányoztam. Az ABA jelátviteli út indukcióját az *NCED3 (AT3G14440)* génen keresztül figyeltem meg, míg a foszfátéhezés bekövetkeztét az *IPS1* (*AT3G09922*) erőteljes indukciója jelezte. Vizsgáltam a *PHR1 (AT4G28610)* and *PHL1 (At5G29000)* gének expressziójának változását is. Kísérleteimben mindvégig az actin (*Act-1*) *(AT2G37620*) szolgált belső kontrollként.

Élesztő egy-hibrid rendszer (Y1H)

Az élesztő egy-hibrid rendszer a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat *in vivo* tanulmányozó élesztő két-hibrid rendszerből módosított, a fehérje-DNS kölcsönhatások feltérképezésére használandó vizsgálat. Esetünkben az Ouwerkerk és mtsai (2001) által kidolgozott protokolt és törzseket használtuk. Első lépésben egy, a növényi izolált DNS-ből PCR segítségével kinyert 1.95 kbp hosszú szakaszt klónoztunk pHis3NB vektorba. Ennek a célja az volt, hogy a saját szekvenciánkkal együtt a későbbiekben egy a hisztidin auxotrófiát kiküszöbölő *HIS3* szekvenciát is bevigyünk az élesztőbe, ami esetünkben az Y187-es *Saccharomyces cerevisiae* törzs volt.

Az Y187 élesztőtörzs genotípusa: MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met–, gal80Δ, URA3::GAL1$_{UAS}$-GAL1$_{TATA}$-lacZ.

Az élesztőbe való transzformáláshoz a pHis3P5CS1 konstrukció egy darabját egy restrikciós emésztés után pInt1 vektorba klónoztuk. Ez a vektor tartalmazta az élesztő PDC6 lókuszának két határoló szekvenciáját, ezek közé épült be a vizsgálandó promóter fragment és szelekciós marker. Az élesztő transzformációja (Gietz, 2002.) során az promóter fragment homológ rekombinációval stabilan integrálódott az élesztő genomjába, amit az élesztő hisztidint nem tartalmazó táptalajon történő növekedése világosan jelzett. Ezt követően kolónia PCR-rel és szekvenálással győződtünk meg a fragment helyes beépüléséről.



3. ábra, Az élesztő egy-hibird rendszer konstrukciói és a könyvtár-transzformálása a csali szekvenciát tartalmazó élesztőbe (Ouwerkerk and Meijer 2003.)

A következő lépésben két egymástól független cDNS könyvtárral transzformáltuk a *P5CS1* fragmentet hordozó élesztőt (3. Ábra). Ezek egyike a pGAD10 expressziós könyvtár volt, amely 3 hetes növények zöld vegetatív részeiből készült (MATCHMAKER cDNA Library, Clontech), a másik pedig a Kim & Theologis lambda-ACT 2-hybrid (https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=library&id=23) könyvtár volt. Ezek az Arabidopsis cDNS mellett hordozták az élesztő *leu2* génjét is. Sikeres transzformációt követően hisztidin és leucinmentes táptalajon kolóniák jelentek meg. A transzformációk

után mindkét esetben rendszeresen ellenőriztem a lemezeket és az első 50-50 felnövő kolóniát oltottam tovább. A felnőtt telepekről kolónia PCR készült a vektorok által megadott határoló (ún. border) primerek használatával. A termékeket agaróz gélen megfuttatva a 900-1000 bp-nál nagyobb fragmenteket kerestük. Ezek, méretükből adódóan tartalmazhatnak konkrét géneket megadó fragmenteket. Az említett fragmentméretet tartalmazó telepekből folyadékkultúrát indítottam és DNS-t izoláltam Winston és mtsai (1990) alapján, majd ezeket megerősítésképpen visszatranszformáltam a $Y187_{P5CS1}$ élesztőkbe. Amennyiben az élesztő ismét kinőttek a –His-Leu szelektív táptalajon, a következő lépésben kapilláris szekvenálásra küldtük a mintáinkat, hogy azonosítani tudjuk a kölcsönható partnereket. A kapott szekvenciákat az NCBI Blast szekvencia összehasonlító program felhasználásával vizsgáltuk és azonosítottuk. A visszatranszformálás, a határoló primerekkel végzett PCR és a szekvenálás után a kiindulási kolóniákból jelentősen kevesebb maradt, mindössze néhány potenciális interaktor vizsgálatával foglalkoztunk tovább.

Electrophoretic mobility shift assay

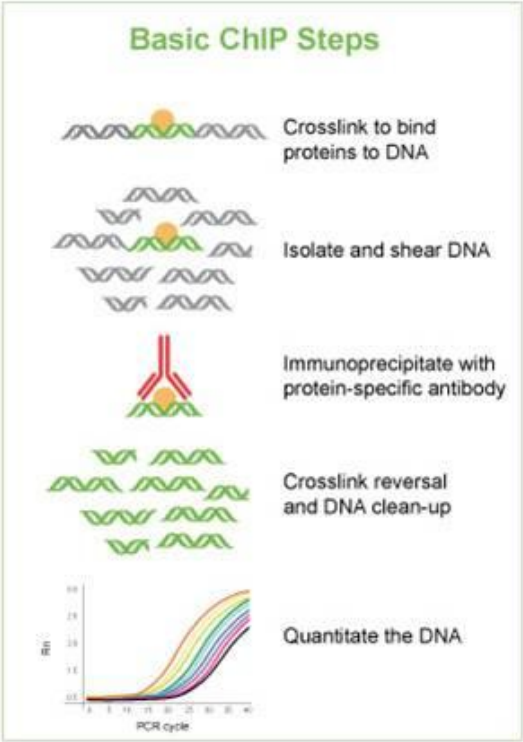
Az élesztő egy -hibrid rendszerben kapott fehérje-DNS kölcsönhatásokat minden esetben validálnunk kell egy vagy több független módszerrel. Az egyik erre alkalmas az Electrophoretic Mobility Shift Assay, amely azon alapul, hogy a DNS-fehérje komplex migrációja a gélben lassabb, mint a DNS-é önmagában. Ehhez szükségünk van izolált transzkripciós faktorra, amely esetünkben az *Arabidopsis thaliana* PHR1 illetve PHL1 fehérjék DNS-kötésért felelős C-terminálisa volt, *Escherichia coli*-ban termeltetve. Próbálkoztunk az említett fehérjéket teljes hosszukban megtermeltetni, de ez csak az egyik (a PHL1) esetben járt sikerrel, és mivel a DNS-kötő hely a fehérje C-terminálisan található és irodalmi adatok szerint elfogadott és eredményes az ezekkel végzett kísérlet, ezeket alkalmaztuk. A fehérje termeltetéséhez az említett C-terminális fragmenteket kódoló régiókat amplifikáltuk, majd pET28a+ vektorba (Invitrogen) klónoztuk, a kész és ellenőrzött konstrukciókat BL21 DE3 Rosetta sejtekben transzformáltunk.

A törzs genotípusa: F^{-} *ompT gal dcm lon*? $hsdS_B(r_B^{-}m_B^{-})$ λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) $[malB^{+}]_{K\text{-}12}(\lambda^{S})$ pRARE[*ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL* ori_{p15A}](Cm^{R}). Ez a törzs egy IPTG-vel indukálható T7 RNS polimeráz promótert tartalmaz, ezt kihasználva folyékony LB táptalajban a sejtek jelentős mennyiségű fehérjét képesek termelni. A termelődő fehérjék a vektor által kódolt His_6-taggel rendelkeznek, a baktériumok lízise utáni fehérjetisztítás ennek segítségével történik His-Select Nickel affinity gel (SIGMA) felhasználásával a gyártó protokolja alapján. A kísérletekhez három különböző DNS fragmentet használtunk, melyeket PCR segítségével generáltunk. Az első, 700 bp hosszú *P5CS1* fragmentet Arabidopsis genomi DNS-ről amplifikáltuk, ez tartalmazta a transzkripciós faktor kötődéséhez esszenciális P1BS helyet. A második fragment az előzővel megegyezett, azonban a kötőhely bázisait elmutáltattuk, a purinbázisokat pirimidinekre cseréltük. A harmadik fragment egy az előzőekkel átfedő, de rövidebb, mintegy 400 bp-os, a P1BS helyet nem tartalmazó szekvencia volt. A fragmenteket agaróz gélen történő futtatás után EZ-10 Spin column PCR purification kittel (Biobasic) izoláltuk és szekvenáltattuk. A fragmenteket a transzkripciós faktorok növekvő koncentrációjával inkubáltuk a következő pufferben: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH: 7.4 (Alves, 2012.). Az elegyet 30 percig szobahőmérsékleten tartottuk és 1.5%-os Tris-acetát pufferben (pH: 8.5) agaróz gélen futtattuk (4 órán keresztül hidegszobában. A futtatás után a gélt etídium-bromiddal (1.5 µg/ml oldat) festettük 2x40 percig, majd fotóztuk és digitalizáltuk UVIDOC HD2 (Uvitech, Cambridge) készülékkel.

Kromatin immunoprecipitáció

Az élesztő egy-hibrid rendszer eredményeit minden kétséget kizáróan az adott organizmusban tudjuk igazolni, ezt mi a PHR1-et hemagglutinin taggel együtt kifejeztető Arabidopsisban végeztük. A kísérlethez felhasználandó 1.5 gr növényi anyag két hetes, Pi- táptalajon nőtt PHR1:HA növényi mintákban a DNS-fehérje kapcsolatokat formaldehiddel keresztkötöttük, majd kromatint izoláltunk a Reimer és mtsai (2010) által leírt protokol szerint. Az immunoprecipitációt a felhasznált mikrogyöngyök használati

utasítása alapján végeztük (µMACS HA Isolation Kit-Miltenyi Biotec). Kontrollként ugyanennek a gyártónak az anti-GFP mikrobeadjét használtuk, arra számítva, hogy ezzel nem tudjuk precipitálni a HA-taggelt fehérjénket, valamint azért, hogy mert ezt alkalmasabbnak találtuk az aspecifikus háttér kiszűrésére, mint egy „üres” gyöngyöt. A keresztkötés feloldását és a DNS tisztítását az ABCAM protokolja alapján végeztük (alapjánhttp://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/chip_plant_arabidopsis.pdf). A kísérlet végén három mintával rendelkeztünk: a HA-microbeaddel precipitálttal, a GFP-microbeaddel precipitálttal, és a még az immunprecipitáció előtt vett „input controllal”.



4. ábra, A kromatin immunoprecipitáció lépései (http://www.epigentek.com/catalog/chromatin-immunoprecipitation.php)

A következő lépésben kvantitatív PCR reakciót végeztünk (4. ábra), melyhez a műszer és a használt program megegyezett a „valós idejű PCR” fejezetben leírtakkal. A PCR-hez használt egyik primerpár amplikonja tartalmazta a P1BS helyet, a másik, kontroll termék pedig egy másik kromoszómán megtalálható fragment volt (4. kromoszóma, 13519698-13519876). A PCR eredményeit ABI SDS szoftverrel dolgoztam

fel, az eredményeket pedig Haring és mtsai (2007) alapján a „background subtraction” módszerrel értékeltem.

Prolin meghatározás

A prolin meghatározását Ábrahám és mtsai (2010) alapján végeztük. 50-100 mg foszfátéheztetett illetve kontroll növényt homogenizáltunk, majd jégen felvettünk mg-monként 5 µl 3 %-os szulfoszalicilsavban. Ezt 5 percig maximális fordulaton centrifugáltuk, majd az extraktból 100 µl-t használtunk fel. Ezt 500 µl 3 % szulfoszalicilsav:96 %-os ecetsav:savas ninhidrin (2.5 g ninhidrin 100 ml 96 %-os ecetsav es 6 M foszforsav 60:40 aranyú keverékében oldva) 1:2:2 arányú keverékéhez adtuk, majd 96 ˚C-on 60 percig inukbáltuk. Ezután a jégen lehűtött mintákat 1 ml toluollal extraháltuk. A toluolos fázist 520 nm-en fotometráltuk, a koncentrációt egy hígítási sorra (1mM-0,5mM-0,25mM-0,125mM-0,0625mM-0,03125mM-0,015625mM-0mM prolin) felvett kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg.

Lipid-peroxidáció vizsgálata

A lipid peroxidáció mérése Heath és Pecker (1968) alapján történt. 100 mg növényt 500 µl 0,1 %-os triklór-ecetsavban (TCA) homogenizáltunk, majd centrifugálás után (5 perc, maximum fordulat) a felülúszót háromszoros térfogatú 20 %-os TCA-ban oldott 0.5% i tiobarbitursav oldattal elegyítettük, majd 95˚C-on 25 percig inkubáltuk. Az inkubáció letelte után a reakciót jégen leállítottuk, a mintákat centrifugáltuk (4 ˚C, max. fordulat, 5 perc) majd fotometráltuk 600 és 532 nm-en. Utóbbi hullámhosszon a tiobarbitursavnak a malondialdehiddel - amely a lipidperoxidáció terméke - alkotott komplexét detektálhatjuk. A végeredményt µmol MDA/g FW-ben kapjuk meg a Lambert-Beer törvény alkalmazásával, a malondialdehid-tiobarbitursav komplex εM= 155/mM/cm moláris extinkciós koefficiensét használva.

A hidrogén-peroxid szint meghatározása

A kísérletet Velikova és mtsai (2000) alapján végeztük el. A növényeket 0.1 %-os TCA-val homogenizáltuk, majd maximum fordulaton 15 percig centrifugáltuk. A felülúszóhoz 1:1:2 arányban 10 mM kálium-foszfát puffert (pH: 7) és 1 M KI oldatot adtunk. Az így keletkező sárgás színű termék abszorbanciáját 390nm-en mértük, a keletkező H_2O_2 koncentrációját kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg. A hidrogén-peroxid szintről *in situ* is információt nyerhetünk DAB (diamino-benzidin)-festéssel, ezt Daudi és mtsai (2012) alapján végeztem.

A klorofilltartalom mérése

A növények klorofilltartalmát acetonos extrakció után határoztam meg. A növényeket homogenizálás nélkül Eppendorf csövekbe gyűjtöttem, majd 1 ml 80%-os acetonnal extraháltam, míg teljesen a színüket nem vesztették. A felülúszó abszorpcióját 663,6 és 646,6 nm-en megmértem, a klorofill a és b tartalmat Porra és mtsai (1989) alapján határoztam meg, majd a növények tömegével normalizáltam.

Fehérje izolálás, poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot

A foszfátéheztetés során a P5CS1 enzimtartalomban bekövetkező változások megismeréséhez P5CS1-GFP transzformáns növényből-melyben a P5CS1 stop kodonját eGFP szekvenciára cserélték (Székely et al 2008.)- fehérjét tisztítottunk. A növényi mintát dörzsmozsárban, kvarchomokkal folyékony nitrogénben homogenizáltuk és 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 1 mM EDTA,1 mM DTT, 1 % Triton X-100, és 1x proteáz inhibitort tartalmazó pufferben felvettük. 5 percig mikrocentrifugában maximum fordulatszámon centrifugáltuk 4˚C-on, majd a felülúszó fehérjekoncentrációját Bradford (1976) alapján Bio-Rad fehérjemeghatározó kittel megmértük. A mintákból egységesen 30 µg-ot 12%-os SDS-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) elválasztottunk (Sambrook és mtsai, 1989) előfestett protein marker mellett (Pageruler Plus Prestained Protein Ladder #26619 Thermo Fisher Scientific). A következő lépésben a fehérjéket

Immobilon-P (Millipore IPVH00010) membránra vittük át elektroblottolással. A membránt TBS-ben mostuk, majd telítés céljából 1 órán át 5% zsírszegény tejport tartalmazó 1xTBST (50 mM Tris-HCl pH: 8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) oldattal inkubáltuk. Ezt követően 2x 5 percig TBST-vel mostuk, majd két órán keresztül a telítő oldatban 1:1000 hígításban feloldott, egérben termeltetett anti-GFP ellenanyaggal (Roche 1814460) inkubáltuk tovább. Ezt követően 5x10 mp-ig desztillált vízzel mostuk, majd inkubáltuk 5 percig TBS-ben, 10 percig TBS+0,25 % Tween-20, majd 10 percig TBST oldatokban. Másodlagos ellenanyagként peroxidáz kapcsolt anti-egér ellenanyagot (Pierce-31430) 1:5000 hígításban használtuk telítő oldatban 1 órán át. Az inkubáció letelte után 3x10 percig mostuk a membránt TBST-vel. A fúziós fehérje detektálására Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore WBKLS0500)-t reagenst használtunk. A sikeres előhívást követően a membránt amido blackkel (0,1% amido black (Abcam), 7,5% ecetsav és 20% methanol vizes oldata) festettük meg.

Mikroszkópos kísérletek

Dolgozatban szereplő mikroszkópos fotókat P5CS1-GFP génfúziót expresszáló transzgenikus növényben, melyben a gén saját promótere szabályozása alatt áll, STOP kodonja helyére pedig a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kódoló szekvenciáját illesztették (Székely et al 2008.). Olympus SZ12X sztereomikroszkóppal készítettük.

Bioinformatikai módszerek

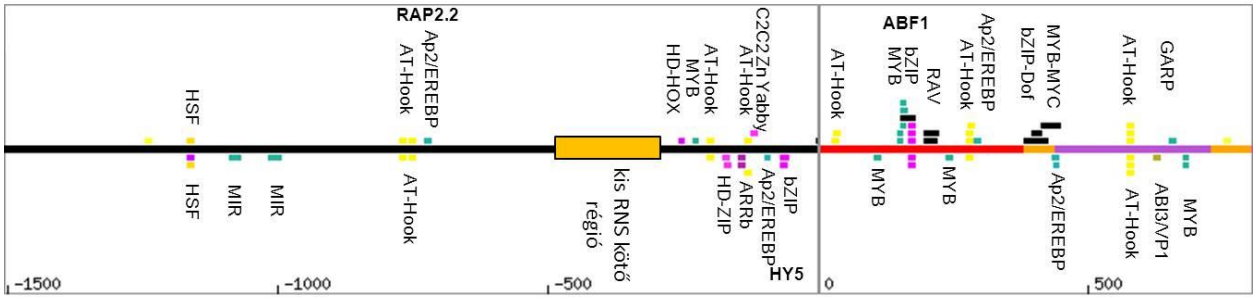
Munkánk során következő programokat, internetes portálokat használtuk fel:
Az *Arabidopsis thaliana* génjeinek és a felhasznált vektoroknak a szekvenkciáit a TAIR (www.arabidopsis.org) és az NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) adatbázisaiból nyertük. A DNS szekvenciákból az aminosav sorrend meghatározását az ExPASy DNA Translate programmal kaptam meg (Swiss Institute of Bioinformatics). A klónozásokkor használt restrikciós helyeket a NEBcutter V2.0 programmal terveztük meg (www.labtools.us), a PCR primereket pedig az NCBI Primerblast, illetve az IDTDNA (www.idtdna.com)

PrimerQuest alkalmazásaival terveztük meg. A növényekről készült képek kiértékeléséhez a pSize programot használtuk.Az összetett mikroszkópos képeket Adobe Photoshop és Illustrator (http://www.adobe.com) programok segítségével hoztuk létre, valamint a Microsoft Office programcsomagot használtuk a dolgozat megírásához, az adatok és táblázatok kezeléséhez.

EREDMÉNYEK

A P5CS1 transzkripcióját szabályozó faktorok azonosítása élesztő egy-hibrid rendszer segítségével

Az *P5CS1* gén szekvenciájának *in silico* vizsgálata során azt találtuk, hogy a gén promóterében, az 5' nem transzlálódó régióban és a gén első intronjában számos, többek között a MYB és a G-BOX családba tartozó transzkripciós faktor kötőhelye is megtalálható. A vizsgált szekvenciában két feltételezett HY5 kötőhely is található, melyek valószínűsítik, hogy a *P5CS1* regulációjában fontos szerepe lehet a fénynek. A promóterben megtalálható egy kis RNS-eket kötő szekvenciákban gazdag szakasz is. Ezek a komplemeter RNS-ek az "RNS-függő DNS-metiláció" folyamatán keresztül fejthetik ki hatásukat és elsősorban a génkifejeződés gátlásában játszanak szerepet. Annak érdekében, hogy azonosítsuk a *P5CS1* gén promóteréhez kötődő valós szabályozó faktorokat, élesztő egy-hibrid analízist végeztünk. "Csali" szekvenciaként a gén promóterének egy 1,95 kb hosszú fragmentjét használtuk fel, amely tartalmazta az első intront is. A promóter és az 5' nem transzlálódó régió számos konzervált cisz ható elemet tartalmaz, amik transzkripciós faktor kötő helyek lehetnek (5. ábra).



5. ábra, A P5CS1 gén promoterén található predikált transzkripciós faktor kötőhelyek és kis RNS kötőhelyek elhelyezkedése

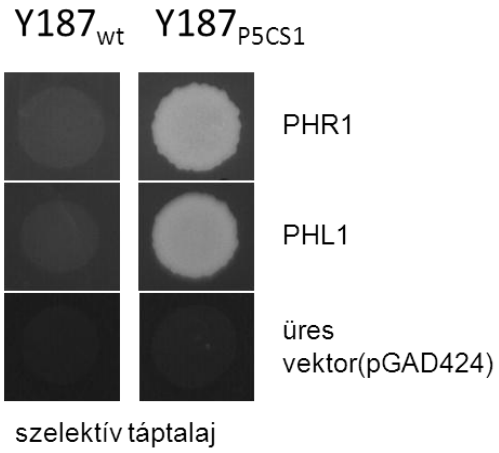
Az 5' szabályozó elemeken túl számos gén esetében az intronokról is bebizonyosodott, hogy befolyással vannak a transzkripcióra, ilyen például az *Arabidoposis thalianában* a nagy affinitású foszfát transzporter (*AtPht1;4)* is. Emiatt döntöttünk úgy, hogy az 1.2 kb promoter együtt az ún, nem transzlálódó (UTR) regió

mellett a 0.75 kb átíródó régiót (az első két exont és az első intront) tartalmazó genomi szakaszt is felhasználunk a kísérletben. Az első lépésben az említett *P5CS1* szakaszt és egy szelekciós markert (*his3* gén) tartalmazó és stabilan kifejező Y187 élesztőtörzset készítettük el, ezt követte a transzformálás két egymástól független könyvtárral: a pGAD10 3 hetes növények zöld vegetatív részeiből készült, (MATCHMAKER cDNA Library, Clontech), a másik pedig a Kim & Theologis lambda-ACT 2-hybrid (https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=library&id=23) könyvtár. A transzformálás után nyomon követtük a kolóniák megjelenését a lemezeken és könyvtáranként az elsőként felnövőeket tartottuk meg, és oltottuk tovább. Összesen 86 élesztő kolóniát oltottunk tovább, melyek különböző hosszúságú cDNS inszerciókat tartalmaztak. Ezeket a cDNS-eket izoláltuk, az inszertek szekvenciáit meghatároztuk és az NCBI weboldalán található BLAST programmal azonosítottuk (1. táblázat).

Gén ID	Név	Fehérje, funkció	Találatok száma
AT1G06740	Mustang-3	Mutátor-szerű transzpozáz család. Domesztikálódott traszpozábilis elemet kódol.	1
AT2G02070	ATIDD5	Cink-ujj, C2H2-szerű; szekvencia-specifikus DNS-kötő transzkripciós faktor aktivitás, Cink ion kötés, nukleinsav kötés, kölcsönhatás DELLA-val	3
AT3G28910	MYB30 transzkripciós faktor	Patogén-indukált hiperszenzitív válasz regulátor, részt vesz a brasszinoszteroid és abszcizinsav jelátvitelben.	1
AT4G28610	phosphate starvation response 1 (PHR1)	HTH trszkripció regulátor, Myb-típusú; a foszfátéhezés és a magas fény által kiváltott traszkripció szabályozója.	1
AT5G29000	phosphate starvation response 1-like (PHL1)	HTH transzkripció szabályozó, Myb-típusú	4
AT5G59570	BROTHER OF LUX ARRHYTHMO (BOA)	Homeodomain-szerű superfamily fehérje; HTH, MYB cirkadián transzkripciós faktor	1

1. táblázat, Az élesztő egy-hibrid rendszerben azonosított, a *P5CS1* gén szabályozó szekvencia elemeivel feltehetően kölcsönható transzkripciós faktorok.

Az azonosított kolóniák közül egy teljes hosszban tartalmazta a MYB típusú transzkripciós faktorok közé tartozó Phosphate Starvation Response 1 (*PHR1, AT4G28610*) cDNS-ét, és négy független kolónia a hozzá nagyon hasonló PHR1-like 1 factor (*PHL1, AT5G29000*)-t kódoló szekvenciát–szintén teljsen hosszban. Az élesztő egy-hibrid kísérlet során kapott kolóniákból plazmidot izoláltunk, majd azokat visszatranszformáltuk vad típusú, illetve a *P5CS1* fragmentet tartalmazó élesztőtörzsekbe. Ezek a plazmidok komplementálni tudták a hisztidin auxotrófiát a transzformáns élesztőben, így azok képesek voltak növekedni SD-His-Leu táptalajon, míg a vad típusú Y187 törzs nem. Elvégeztük a transzformációt üres, de leucin auxotrófiát komplementáló vektorral is, azonban ez, a kölcsönható növényi szekvencia hiányában nem eredményezett növekedést SD-His-Leu szelektív táptalajon, tehát a hisztidin auxotrófia komplementálása az élesztőben megtalálható szekvenciával való interakciótól függ (6. ábra). Az élesztő egy-hibrid rendszer -és általában a heterológ rendszerek-eredményeiből meglátásom szerint nem vonhatunk le messzemenőbb következtetést, mint azt, hogy az adott kölcsönhatást érdemes tovább vizsgálni az adott organizmusban de maga a screen, mint esetünkben is, a kis mintaszám miatt nem alkalmas a potenciális kölcsönhatások rendszerszintű értékelésére.



6. ábra, A visszatranszformált élesztőtelepek növekedése szelektív (SD-His-Leu) táptalajon igazolja a kölcsönhatást a *P5CS1* promóter és a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok között.

A PHR1 és PHL1 faktorok jól ismert regulátorai az Arabidopsis foszfátéhezési válaszoknak. Ezekben a génekben közös, hogy tartalmaznak egy konzervált szekvenciát

(P1BS-**P**hr**1** **B**inding **S**ite: GAATATTC), amelyen keresztül a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok képesek az adott génhez kötődni. A “csali” szekvenciájának azonosításakor megtaláltuk ezt a konzervált PHR1 kötőhelyet a *P5CS1* gén első intronjában. A transzkripciós faktor és annak kötőhelye ismeretében leellenőriztük, hogy a P1BS szekvencia megtalálható-e más, a prolinanyagcserében részt vevő gének szekvenciájában is. Több ilyen gén UTR illetve átírodó (intron és vagy exon) szekvenciájában találtunk P1BS szekvencia elemet (2. táblázat), megerősítve azt a feltételezést, hogy a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok a stresszindukált prolinmetabolizmusban is szerepet játszhatnak.

Gén neve	P1BS helyek száma, elhelyezkdése
P5CS1	1 (1. intron), 3’UTR:0
P5CS2	3 (7., 16. exon, 8. intron)
PDH1	1 (1. intron)
PDH2	1 (1. intron)
ProTr1	1 (2. exon)
P5CR	1 (1. exon)
OAT	0
ARGINASE	4 (1., 4., 5. intron; 4. exon)
ProTr2	1 (2. exon)

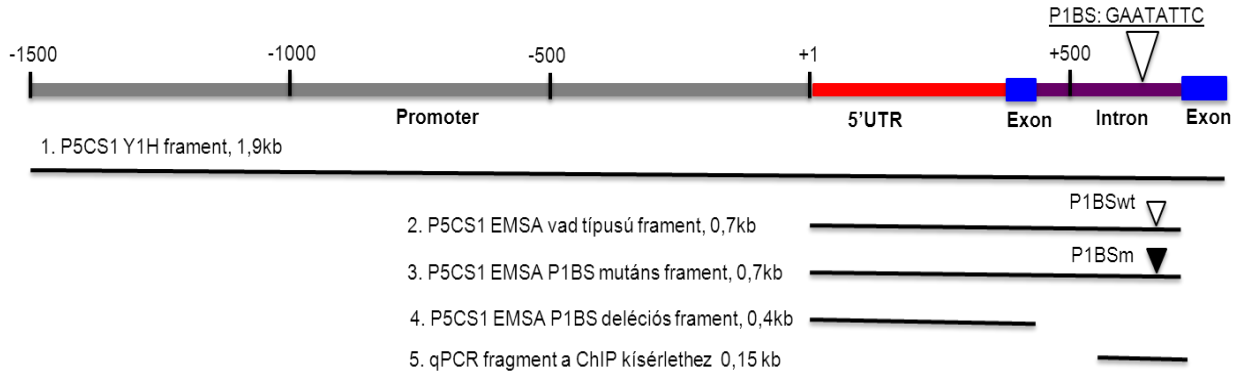
2. táblázat, A P1BS helyek száma és elhelyezkedése az Arabidopsis thaliana prolinmetabolizmusban részt vevő génekben (külön kiemelve azok a gének, amikben a P1BS elem valószínű szabályozó pozícióban helyezkedik el.

A kölcsönhatás in vitro és in vivo igazolása: EMSA, ChIP

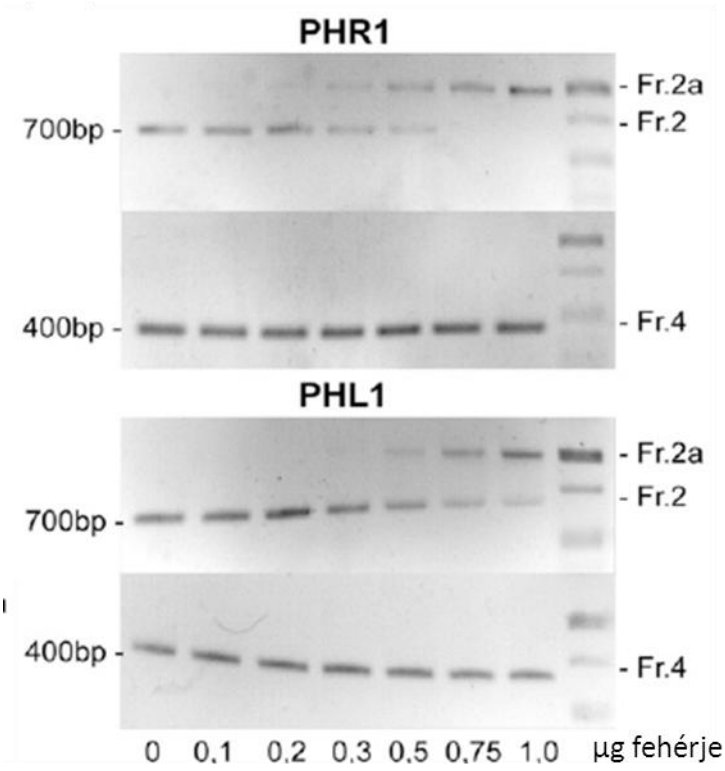
Az élesztő 1-hibrid rendszer eredményeinek megerősítése érdekében független kísérleti rendszereket alkalmaztunk. Elsőként ElectroMobility Shift Assay-jel (EMSA) bizonyítottuk a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok és a kötőhelyet tartalmazó *P5CS1* fragment közötti kölcsönhatást. Az EMSA kísérlethez *Escherichia coli*-ban (BL21(DE3) Rosetta törzs) expresszált és tisztított PHR1 és PHL1 fehérjéket használtunk. A

kísérlethez a két transzkripciós faktor C-terminális régióját baktériumban termeltettük meg, ami lényegesen egyszerűbb, mint a teljes hosszúságú fehérje termeltetése, ugyanakkor ez a régió is tartalmazza a kötési vizsgálathoz szükséges DNS-kötő helyet (domént). Az EMSA kísérletek során először mindkét fehérje esetében bebizonyítottuk, hogy *in vitro* képesek kötődni azokhoz a DNS-fragmentekhez, amelyek tartalmazzák a P1BS helyet.

Kísérleteinkben egy 700 bp-os P1BS-t tartalmazó *P5CS1* fragmentet (fragment 2.), és egy rövidebb, vele átfedő, azonban a kötőhelyet nem tartalmazó fragmentet használtunk (fragment 4.)(7. ábra). Ezeket a fragmenteket külön-külön inkubáltuk a megtermelt fehérjékkel, majd az elegy futtatása és festése után azt tapasztaltuk, hogy a fehérjekoncentráció növekedésével a P1BS-t tartalmazó 2. fragment jelenlétében egyre nagyobb mennyiségű fehérje-DNS komplex alakult ki, a DNS fragmentek gélen látható migrációja megváltozott, és egy felfelé való, előbb részleges, majd teljes eltolódást (ún shiftet) eredményezett. Ezt a 4-es fragment esetében egyáltalán nem tapasztaltuk (8. ábra).

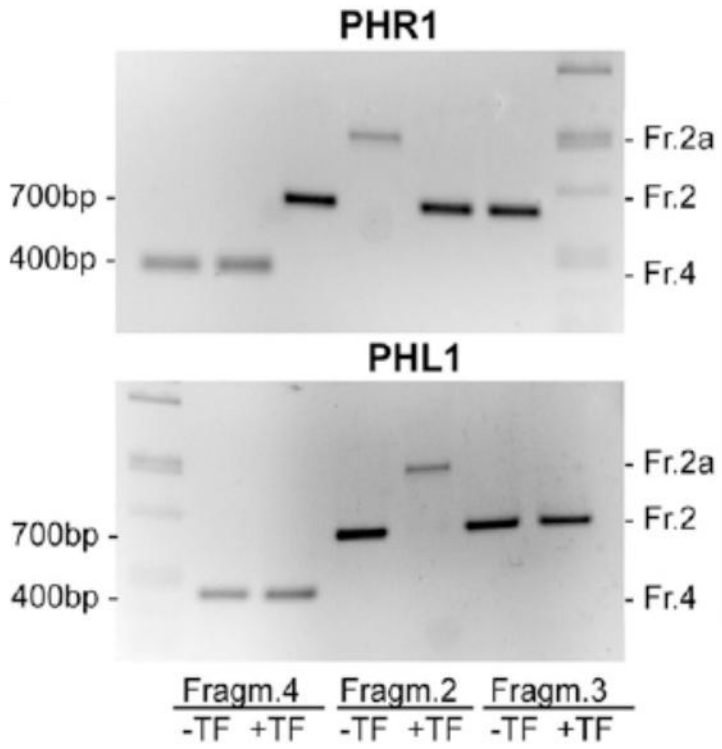


7. ábra, Az élesztő egy-hibrid rendszer, az EMSA és a kromatin immunpprecipitáció kísérletek során használt fragmentek elhelyezkedése a *P5CS1* gén szekvenciáján.



8. ábra, Az EMSA eredménye: A P1BS-t tartalmazó fragment(Fr 2) migrációja a hozzáadott PHR1 illetve PHL1 fehérje mennyiségétől függően részben, vagy teljes mennyiségében(Fr 2a) megváltozott-gél shift következett be. Ezt a 4-es fragment esetében nem tapasztalhatjuk.

Ahhoz, hogy tovább hangsúlyozzuk a kötőhely meglétének fontosságát, elvégeztük a kísérleteket a korábbi 700 bp-os fragmenttel is, amelyben a P1BS-t elmutáltuk (GAATATTC -lecseréltük TCCGCGGA-ra). A mutáns kötőhelyet tartalmazó fragment migrációja nem változott meg a fehérjék hozzáadásával (9. ábra), ami egyértelműen azt bizonyítja, hogy a *P5CS1* első intronjában található P1BS helyhez kötődnek a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok.

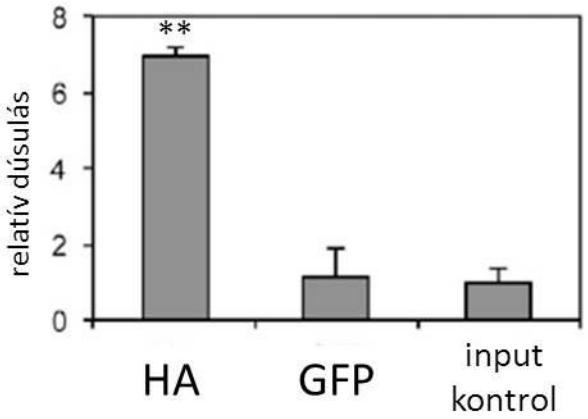


9. ábra, A megváltoztatott P1BS szekvenciával rendelkező 3-as fragment gélbeni migrációja, hasonlóan a 4-es fragmentéhez, azaz nem változott meg a PHR1 és PHL1 hozzáadásával, vagyis a kötőhely hiányában a DNS-fehérje kölcsönhatás nem történik meg.

A PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok és a *P5CS1* promótere közötti kölcsönhatás meglétéről akkor bizonyosodhatunk meg minden kétséget kizáróan, ha ezt a növényben is igazolni tudjuk. Azért, hogy *in planta* megerősítsük a PHR1 transzkripciós faktor kötését a *P5CS1* szekvenciájához, kromatin immunoprecipitáció (ChIP) tesztet végeztünk hemagglutinin taggelt PHR1-et termelő (PHR1:HA) stabil transzformáns Arabidopsis vonallal. Ennek segítségével precipitáltuk a kromatin kivonatunkból a HA-val kapcsolt PHR1-gyel kölcsönható DNS fragmenteket. Ugyanezt az precipitálást negatív kontrollként anti-GFP mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotech) is elvégeztük.

A gyöngyökön történő tisztítási lépések után a kötött DNS fragmenteket eluáltuk és analízisükre kvantitatív PCR-t használtunk. Ezzel meghatároztuk, hogy a PHR1 fehérje milyen DNS fragmentekhez kötődött.. A kvantitatív PCR-ben három mintát hasonlítottunk össze: *a,* az immunoprecipitáció előtt félretett input kontrollt; *b,* a hemagglutinin mikrogyönggyel, illetve *c,* a GFP mikrogyönggyel precipitáltat. A kísérlet

során az egyes mintákban a P1BS-t tartalmazó *P5CS1* fragment mennyiségét hasonlítottuk össze egy a kötőhelyet nem tartalmazó P5CS1 fragment mennyiségével.A kvantitatív PCR adatok kiértékelésekor megfelelő normalizálás után (lásd Anyag és Módszer) a HA microgyönggyel precipitált mintában a specifikus kötőhelyet tartalmazó fragment hétszeres „feldúsulása" volt megfigyelhető. Az immunoprecipitáció előtt vett kontrollban (input), illetve a GFP specifikus mikrogyönggyel precipitált mintákban (GFP) feldúsulást nem tapasztaltunk. A ChIP eredménye megerősítettete a PHR1 transzkripciós faktor és a *P5CS1* gén első intronja közötti kölcsönhatást a növényi sejtekben (10. ábra).

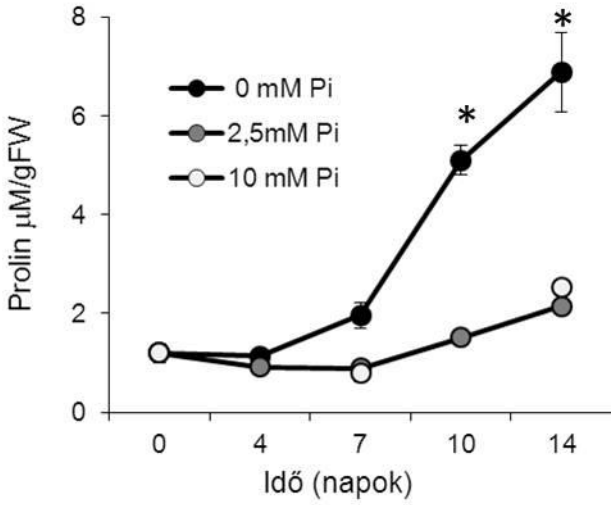


10. ábra, A ChIP kísérlet eredménye: a PHR1 in vivo kötődik a P1BS helyet tartalmazó P5CS1 szekvenciához. A kiértékelés során a P1BS helyet tartalmazó fragment mennyiségét a kötőhelyet nem tartalmazó fragment mennyiségéhez (=1) hasonlítottam az egyes mintákban. A grafikonon látható, hogy a GFP mikrogyönggyel precipitált, illetve az input kontroll mintákban nem tapasztaltuk a kötőhelyet tartalmazó fragment feldúsulását, míg a HA mikrogyönggyel precipitált mintában annak 7-szeres dúsulása figyelhető meg.

A prolinmennyiség változása Arabidopsis thaliana-ban foszfátéheztetés során

A prolinfelhalmozódás ozmotikus és sóstressz esetében egy részletesen leírt jelenség, melynek szabályozásában abszcizinsav függő és független reakcióutak játszanak szerepet. A PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok kötődése a *P5CS1* szekvenciához azt sejteti, hogy a prolin metabolizmusára hatással lehet a foszfát hozzáférhetősége illetve azok szintje a növényben.

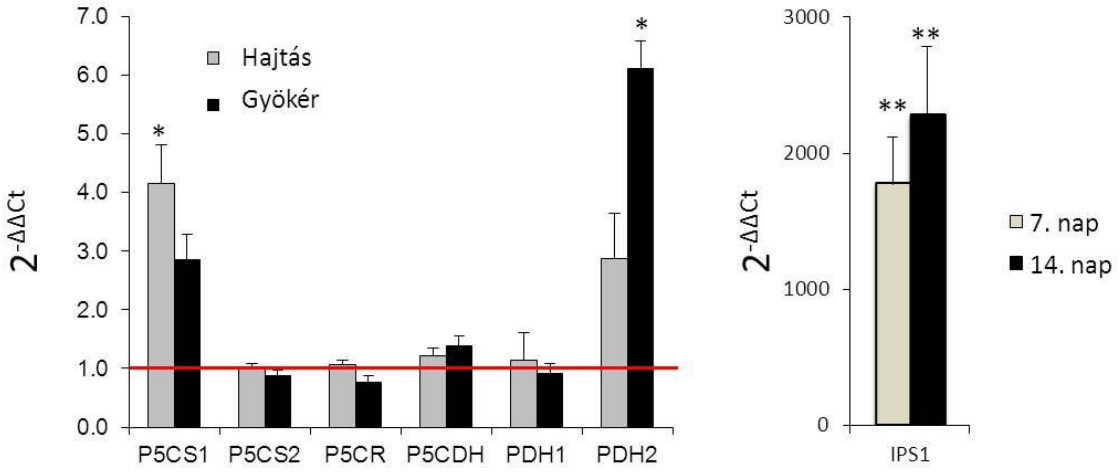
Amikor vad típusú (Col-0) Arabidopsis növényeket normál, 2,5 mM foszfátot (KH_2PO_4) tartalmazó táptalajon csíráztattunk, majd öt nap elteltével szintén normál, illetve szervetlen foszfátot nem tartalmazó táptalajra helyeztünk, a prolinkoncentráció negyedik nap után emelkedni kezdett és 14 nap után négyszer magasabb volt a kontrol, 2,5 mM foszfátot tartalmazó táptalajon növő növényhez képest. Ha a táptalaj foszfát koncentrációját négyszeresre emeltük (10 mM), a prolinszint nem változott a 2,5 mM-t tartalmazó táptalajon növő növényekhez képest (11. ábra).



11. ábra, A prolinkoncentráció változása 14 napig foszfátéheztetett, vad típusú *Arabidopsis thalianában* (a szórások standard hibát jelentenek, a * pedig t-teszt szerinti $p<0,05$ szignifikanciát)

A prolinmetabolizmusban részt vevő gének kifejeződésének vizsgálata

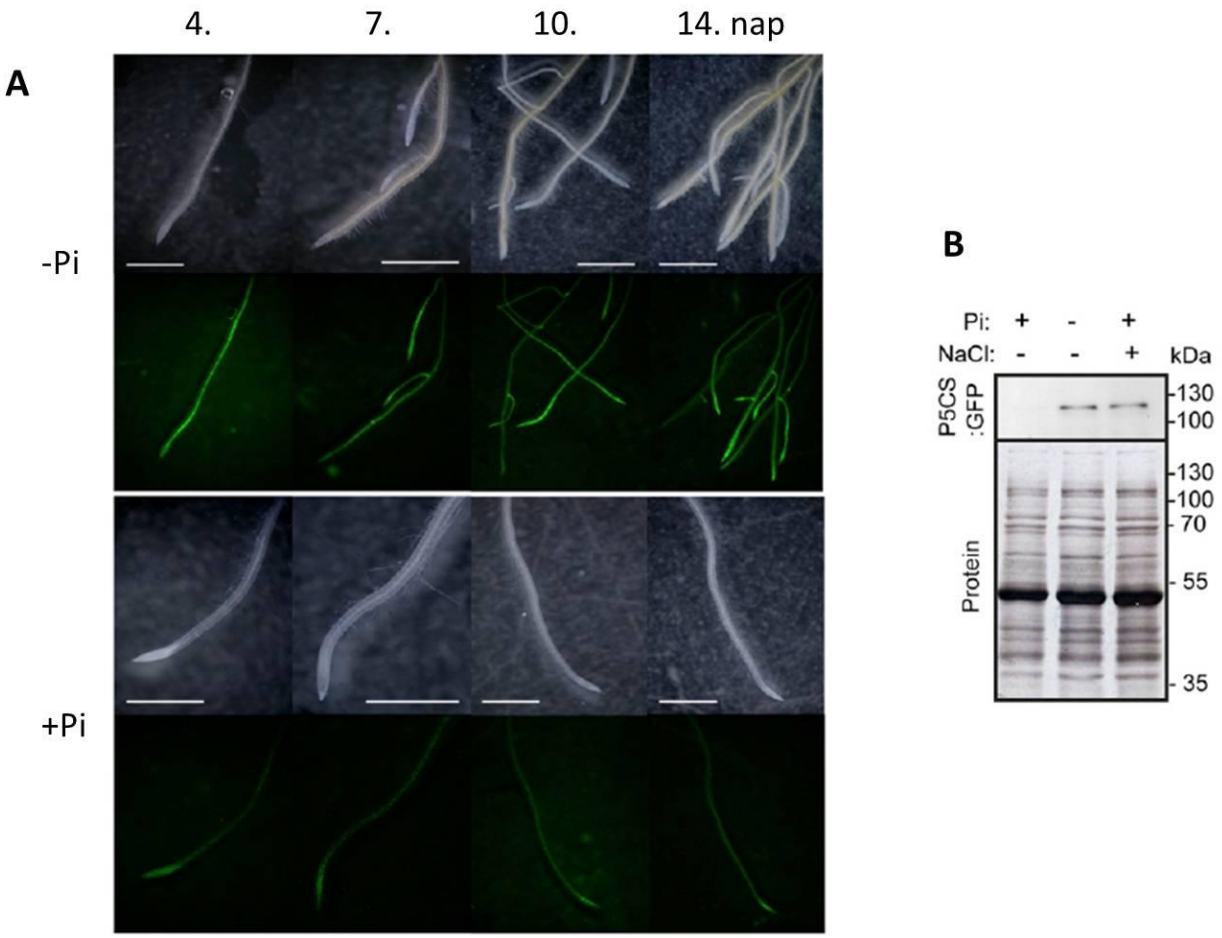
Azért, hogy jobban megértsük foszfátéhezésben a prolin akkumulációért felelős molekuláris mechanizmusokat, megvizsgáltuk a prolinmetabolizmust szabályozó gének expressziós változásait hajtásban is és gyökérben is. Foszfátéhezésben a stresszindukált prolinmetabolizmusban kulcsszerepet játszó *P5CS1* gén expressziója 3-5-szörösére, míg a prolin degradációjában fontos *PDH2* géné 4-6-szorosára emelkedett hajtásban és gyökérben egyaránt. A prolin metabolizmusban résztvevő további gének, mint a P5C szintézisért normál körülmények között felelős P5CS2, a prolinszintézist közvetlenül katalizáló P5CR, illetve a prolin lebontásáért felelős PDH1, és P5CDH enzimeket kódoló gének expressziós értékei nem, vagy csak kismértékben változtak. Bár az indukált *P5CS1* és *PDH2* gének transzkripciós szintjei alacsonyabbak voltak, mint a nem indukált *P5CS2* és *PDH1* géneké (12. ábra), utóbbiakra nem volt hatása a foszfátmegvonásnak. A foszfát éhezés molekuláris markereként az IPS1 (**I**nduced by **P**hosphate **S**tarvation **1**) gént alkalmaztuk, amely a PHR1 közvetlen szabályozása alatt áll, és foszfát éhezéskor transzkript szintje több ezerszeresére emelkedett.



12. ábra, A prolinmetabolizmusban szerepet játszó gének expresszióváltozása 14 nap után és az *IPS1* kifejeződésének változása foszfátéheztetés hatására *Col-0* ökotípusban (relatív $2^{-\Delta\Delta Ct}$ értékek, Pi+=1; a szórások standard hibát jelentenek, a * ill. a ** $p<0,05$ ill $p<0,005$ szignifikancia értéket jelez a Pi+-hoz viszonyítva.).

A P5CS1 fehérje mennyiségének térbeli és időbeli változása, a gyökérnövekedés alakulása foszfátéhezés hatására

Azért, hogy tanulmányozzuk a P5CS1 fehérjeszintjének térbeli és időbeli változását a foszfátéheztetés alatt saját promoteres, P5CS1:GFP fúziót expresszáló transzgenikus növényeken (Székely et al., 2008) tanulmányoztuk a GFP fluoreszcencia változásait. Ebben a kísérletben a fehérjeszintű megfigyeléseken túl lehetőségünk nyílt foszfátstressz egyik legszembetűnőbb hatását, a gyökérszerkezet megváltozását is nyomon követni. A vizsgált növények mindegyikében megfigyelhető volt a főgyökér növekedésének gátlása és az oldalgyökerek megnövekedett száma is. A GFP fluoreszcencia kontroll táptalajon kizárólag a főgyökér gyökércsúcsában volt látható, míg foszfáthiányos táptalajban más növényi részben is megfigyelhető volt. A GFP jel a gyökér megnyúlási zónájában már 4 nappal a foszfátéheztetés kezdete után megemelkedett, amikor más fenotípusos válszok még nem alakultak ki. Az intenzív gyökérnövekedés egy karakterisztikus válasz a foszfátéheztetésre, a növény ezzel próbálja elérni azt, hogy még nagyobb talajfelülethez jusson. A GFP fluoreszcencia erős volt az újonnan kialakuló oldalgyökerekben is, ami tipikusnak mondható 7 vagy annál több napig tartó foszfátéheztetés után (13A. ábra). A P5CS1:GFP sejten belüli lokalizációjában nem találtunk különbséget az éheztetett és a kontroll körülmények között növő növények között. Western blot analízis során a kontroll körülmények között növő növényekből nem tudtunk GFP jelet detektálni, viszont a foszfátéheztetett minták erős, határozott szignált adtak. Hasonló jelerősséggel találkoztunk, amikor ezeket a növényeket mérsékelt sóstressznek (75mM) tettük ki, amelyről már bizonyított, hogy megnöveli a P5CS1 szintézisét (13B. ábra). Ezen eredmények igazolják, hogy a *P5CS1* aktiválódik a foszfátéhezés során, és a megnövekedett bioszintézis prolinakkumulációhoz vezet.

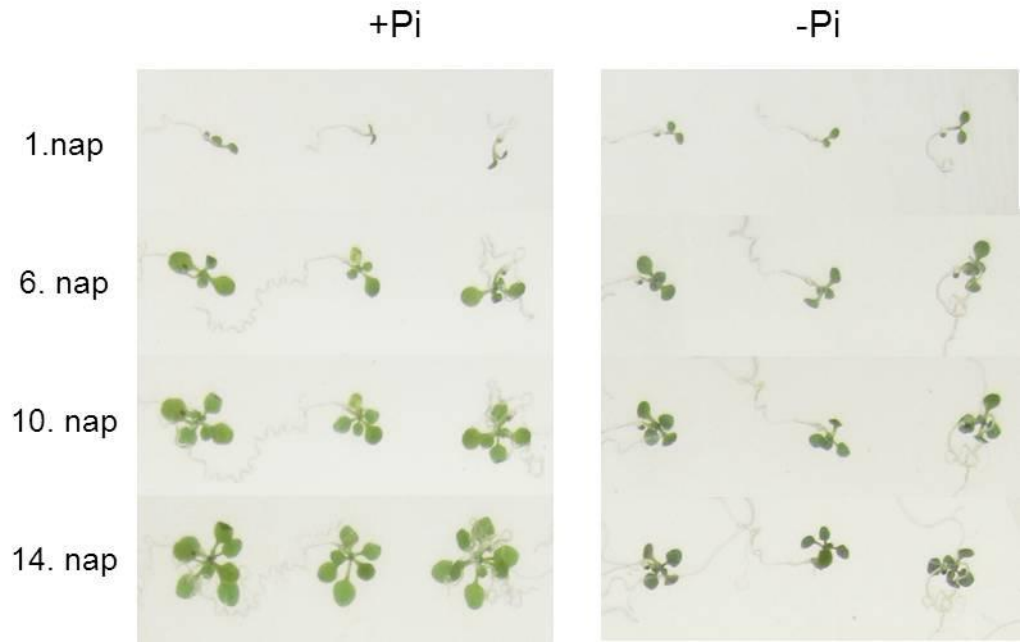


13. ábra, (A) -A gyökérszerkezet és a P5CS1-GFP fluoreszcencia megváltozása foszfátéhezés hatására. (B) Western blot analízis egész növényből. Foszfáthiányos táptalajon nőve a P5CS1-GFP termelődés indukciója figyelhető meg, ennek mértéke megfelel a 75mM sóval végzett stresszkezelés során tapasztalt emelkedésnek.

A foszfátstressz élettani hatásai vad típusú növényekben

A foszfátstressz és más tápanyagok hiánya esetén a károsodás minimalizálása érdekében a növények megváltoztatják anyagcseréjüket, módosítják hajtás és gyökérszerkezetüket. Ezt a cél szolgálja a gyökérben a főgyökér növekedésének gátlása és ezzel egyidőben az oldalgyökerek számának növelése a minél nagyon talajfelület kiaknázása érdekében. A hajtásban a méret csökkenése mellett az egyik legszembetűnőbb változás az antociánok felhalmozása (14. ábra) és a levelek fakulása.

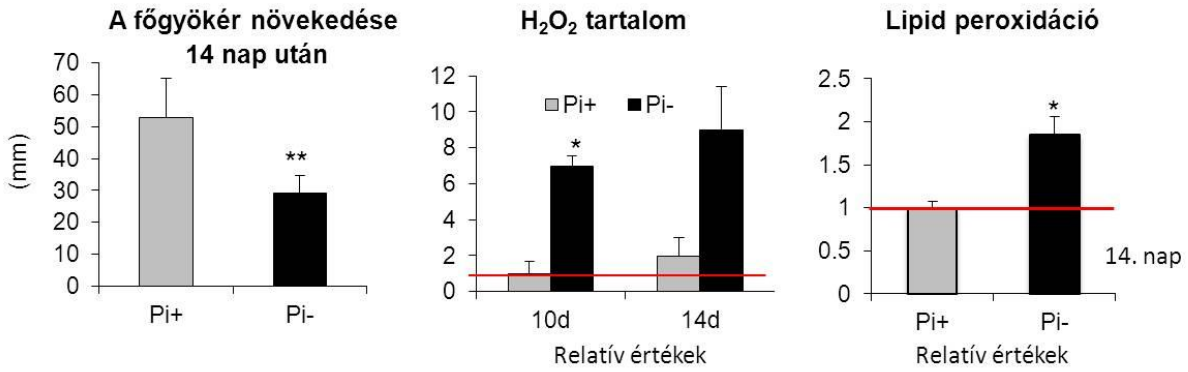
A foszfát, mint az ATP alkotóeleme nagyon jelentős szerepet tölt be a fotoszintézis folyamatában is. A foszfátutánpótlás hiánya miatt a növény, bár elegendő klorofill áll rendelkezésére, nem tudja a beérkező fotonok mennyisége által diktált fotoszintetikus kapacitást biztosítani, ami fotoinhibícióhoz és reaktív oxigénformák keletkezéséhez vezet. A növények azért halmoznak fel antociánokat, hogy azok elnyelve a fotonokat, tehermentesítsék a fotokémiai rendszereket, megelőzve a fotoinhibíciót, valamint jelentős szerepük lehet a keletkezett szabadgyökök semlegesítésében is.



14. ábra, Vad típusú Arabidopsis thaliana növekedése 2,5 mM foszfátot tartalmazó (+Pi) és foszfátmentes (-Pi) táptalajon. Az 1., 6., 10. és 14. napon készült fotókon látható, hogy foszfát hiányában a hajtás növekedése gátolt és a fotoszintetikus apparátus megóvása érdekében antocián akkumulációja figyelhető meg.

Az általunk használt kísérleti körülmények között a rozetták növekedéscsökkenése mellett megfigyeltük a főgyökerek növekedésének gátlását is, mint a tápanyaghiányok egyik legjellemzőbb tünetét. A vertikálisan elhelyezett lemezeken növő Col-0 növények, gyökerének hossza a kontrol, Pi+ táptalajban átlagosan 53 mm hosszú volt, míg a foszfáthiányos (Pi-) táptalajon mindössze 29 mm. A gyökér növekedésében a foszfátstressznek látványos hatása volt az is, hogy ezekben a növényekben az oldalgyökér primordiumok a főgyökér teljes hosszában, közel egyenletesen megtalálhatóak voltak, míg a kontroll növények háromszor kevesebb oldalgyökeret

fejlesztettek és ezek eredése a gyökéralap régiójában volt megtalálható. Az éheztetett növények oldalgyökerei jelentősen rövidebbek voltak, mint a kontrolban. Foszfát hiányában a fotoszintézis és a terminális oxidáció folyamataiban jelentkező károsodások reaktív oxigén formák (ROS) termelődését idézik elő. Ezeket mérhetjük közvetlenül (pl. H_2O_2 szint), vagy nyomon követhetjük az általuk előidézett reakciók (pl. lipid-peroxidáció) végtermékeit is. Esetünkben a foszfáthiányos táptalajon növő növényekben 4-7-szer magasabb H_2O_2-t tudtunk detektálni, mint a 2,5 mM foszfátot tartalmazó kontrol táptalajon növő vad típusú növényekben. Az előbbiekben a lipid-peroxidáció mértéke is közel kétszerese volt a kontrollénak (15. ábra).

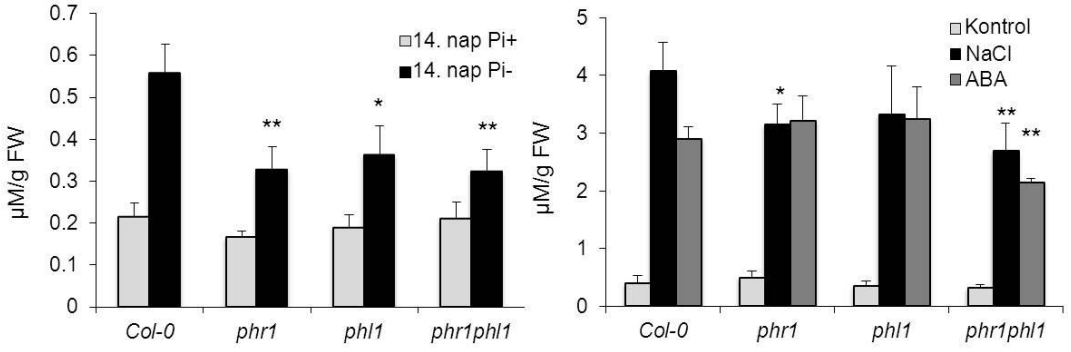


15. ábra, A főgyökér növekedésének gátlása, a hidrogén-peroxid akkumulációja és a lipid peroxidáció fokozódása figyelhető meg foszfátmentes táptalajon. (a szórások standard hibát jelentek; a H_2O_2 akkumulációt bemutató grafikonon a 10 napos Pi+ táptalajon nőtt, a lipid peroxidáció esetében a 14 napos Pi+ táptalajon nőtt növények értékéhez viszonyított számok láthatók, a * $p<0,05$; a ** $p<0,005$ szignifikancia értéket jelez a Pi+-hoz viszonyítva.).

A PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok szerepe a prolinfelhalmozódásban

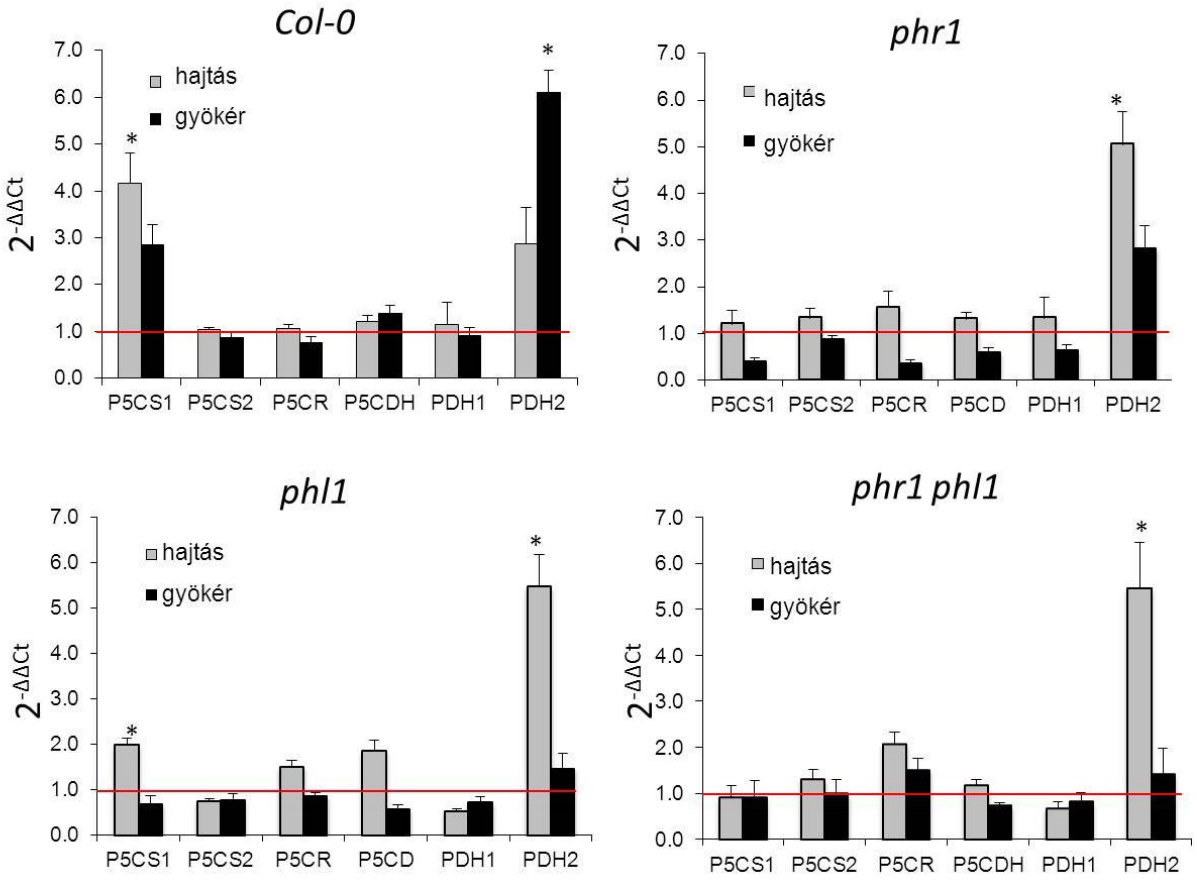
Azért, hogy tesztelni tudjuk a PHR1 és PHL1 faktorok hatását a prolinanyagcsere és felhalmozódás szabályozására, a *phr1, phl1* szimpla valamint *phrphl1* dupla mutánsok prolin szintjeit a vad típusú növényekkel hasonlítottuk össze foszfátléheztetés után. Normál körülmények között ezekben a mutánsokban hasonló prolinszintet mérhetünk, mint a vad típusban, viszont foszfátéhezés alatt a Col-0 növényekben kétszer annyi prolin halmozódott fel mint a mutánsokban. A só és az abszcizinsav által kiváltott prolin felhalmozódást számos tanulmányban leírták már (Székely et al 2008.). A *phr1* és *phl1*

mutánsokban a vad típushoz hasonló prolintartalmat mértünk só és ABA kezelés után, míg a *phrphl1* dupla mutánsokban szignifikánsan kevesebb prolin halmozódott fel (16. ábra). Ebből a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok funkcióinak redundanciájára következtethetünk.



16. ábra, A vad típus illetve a *phr1, phl1* és *phrphl1* mutánsok prolinakkumulációja 14 nap foszfátéhezés; illetve 3 napos 150mM NaCl és 50µM abszcizinsav kezelés hatátásra.(a szórások strandard hibát jelölnek, a csillagok az ábrán a komplett táptalajon nőtt Columbiához mért szignifikáns különbséget jelölik p< 0.05 * és ** p<0.005)

A fenti eredmények arra utalnak, hogy a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok fontosak a prolinakkumuláció szempontjából a foszfátéhezés alatt, és kisebb mértékben befolyásolják a prolin só és abszcizinsav által kiváltott felhalmozódását is. Azért, hogy kiderüljön milyen mértékben befolyásolják ezen transzkripciós faktorok a fontosabb prolinanyagcserében részt vevő gének kifejeződését, megvizsgáltuk a *P5CS1, P5CS2, P5CR, PDH1, PDH2* és *P5CDH* gének kifejeződését a fenti mutánsokban foszfátéhezés után. Míg a vad típusban a *P5CS1* és a *PDH2* expressziója 3-6 szorosára nőtt a foszfátéhezés alatt, a *phr1* és *phrphl1* vonalakban csak minimális *P5CS1* indukciót figyelhettünk meg, de már a *phl1*-mutánsban is jelentősen csökkent a transzkript szintje (17. ábra). A *PDH2* expressziós értékei a hajtásban a vad típushoz hasonlónak bizonyultak, míg a gyökérben alacsonyabbak voltak. A többi vizsgált prolinmetabolizmus gén expressziója nem változott lényegesen az említett mutánsokban.



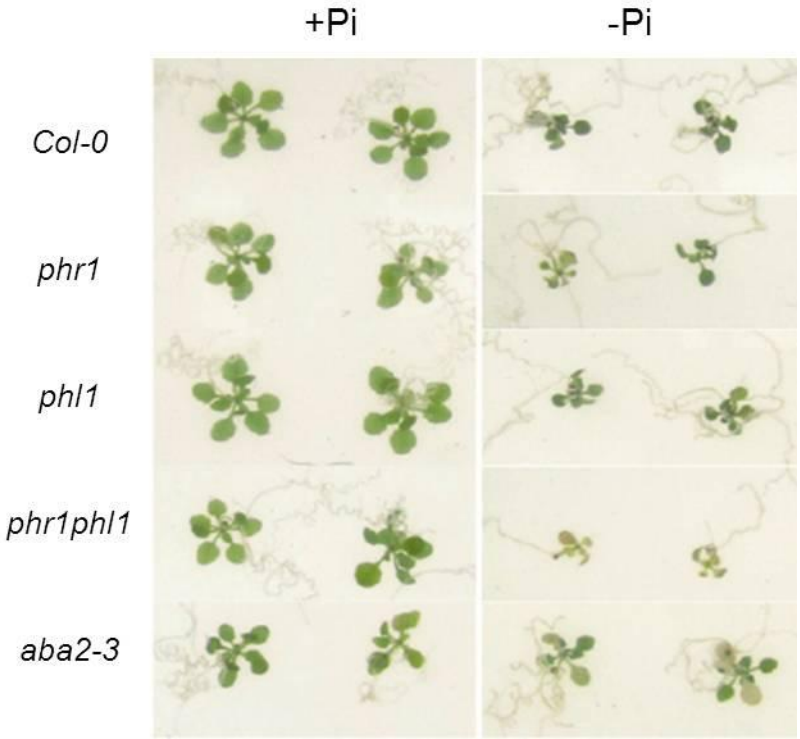
17. ábra, A prolinmetabolizmus szabályozó génjeinek transzkripcióváltozása 14 nap foszfátéheztetés hatására (relatív értékek, Pi+=1; a szórások standard hibát jelölnek, a * és a ** pedig a t-teszt szerinti p<0.05 illetve p<0.005 értékeket a Pi+-hoz viszonyítva)

Az eredményeinket megerősítik tőlünk független transzkriptóm vizsgálatok adatai is. Bár ezekben microarray analízisekben a *P5CS1*-et és *P5CS2*-t nem különböztették meg, (Affymetrix 22.5K ATH1) eredményeikben határozott *P5CS* (1 és 2) valamint *PDH2* expresszió növekedés látható redukált PDH1 expresszió mellett, ugyanakkor más prolinmetabolizmus gének *(P5CR, P5CDH, dOAT*) értékei nem változtak. Ha a vad típussal hasonlítjuk össze, a *P5CS1/2* és a *PDH2* transzkript szintjei mind határozottan alacsonyabbnak bizonyultak a *phr1, phl1* és *phr1phl1* mutánsokban. Míg maguknak a *PHR1* és *PHL1* géneknek az expressziós értékei nem emelkednek meg a foszfátéhezés

során, az általuk kódolt fehérjék nélkülözhetetlenek a foszfáthiány során indukálódó gének megemelkedett expressziójához (esetünkben a *P5CS1* és *PDH2* gének).

Az abszcizinsav szabályozza a prolin felhalmozódást a foszfátéhezés alatt

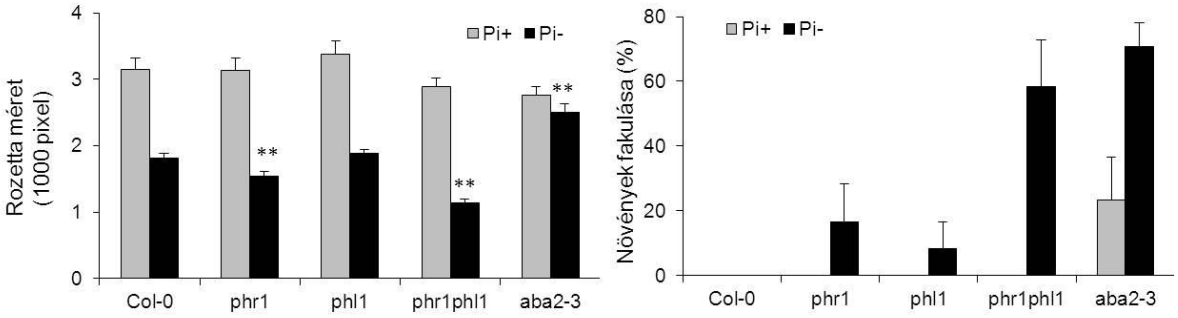
Az általunk használt kísérleti rendszerben a vad típusú Arabidopsis növények növényedése közel 50%-ra esett vissza az foszfátéhezés következtében (18-19. ábra). A rozetták növekedése kontroll körülmények között a *phr1, phl1* és *phr1phl1* vonalakban hasonló volt a vad típushoz, míg foszfát hiányában a *phr1* és *phr1phl1* mutánsok szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a vadtípusú Columbiánál.



18. ábra, A *Col-0* illetve *phr1, phl1, phr1phl1* és *aba2-3* mutáns növények növekedése Pi+ és Pi- táptalajokon 14 napos foszfátéheztetés illetve kontroll körülmények között.

Mivel a prolin bioszintézishez vezető különböző stresszfolyamatokban az abszcizinsav, mint stresszhormon fontos szerepet játszik, így indokolttá vált vizsgálni az abszcizinsav jelátviteli út szerepét a foszfátéheztetés során. Az *aba2-3* vonalak a xantoxin-abszcizinaldehid reakcióban károsultak, így csökkent abszcizinsav termelésre képesek. Ezen mutánsok rozettanövekedését kevésbé fogta vissza az éhezés, mint a

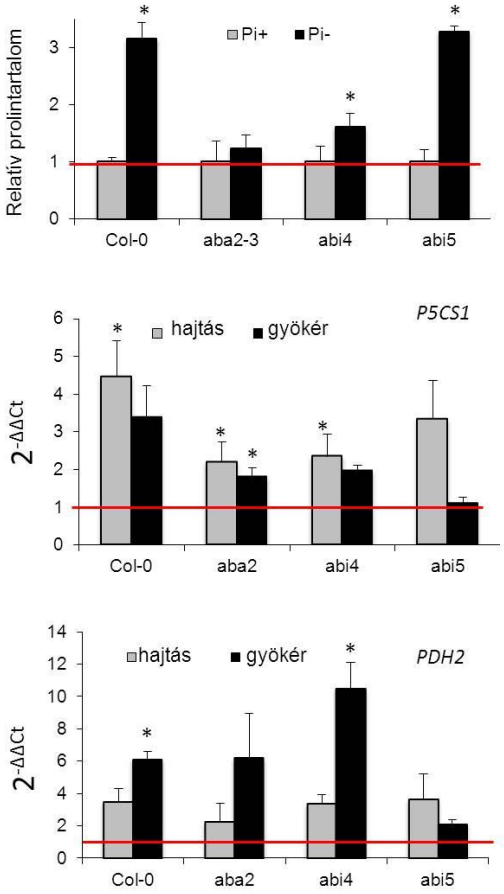
vad típust, vagy a *phr1* vagy *phl1* vonalakat, és mindössze 10%-kal voltak kisebbek, mint kontroll körülmények között (19. ábra). A levelek kifehéredése és nekrózisa a reaktív oxigénformák felhalmozódását, oxidatív károsodást és sejthalált jeleznek, ami fordítottan arányos a növény életképességével. A foszfátéhezés során a vad típusú növények ugyan kisebbek voltak, de a levél nekrózis nem jelentkezett az esetükben, míg a *phr1phl1* mutánsok 60% és az aba2-3 mutánsok 70%-ában ez megfigyelhető volt. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az abszcizinsavnak fontos szerepe van a levélnövekedés lassításában és az életképesség fenntartásában foszfáthiányos körülmények között.



19. ábra, A rozetták méretének változása, illetve a levelek fakulásának megjelenése a foszfátéheztetés következtében a vad típusban és *phr1, phl1, phrphl1* és *aba2-3* mutánsokban (a szórások standard hibát jelölnek, a ** pedig a t-teszt szerinti p<0.005 értékeket a *Columbia*-hoz viszonyítva).

A prolinfelhalmozódás só és ozmotikus stressz hatására történhet abszcizinsav függő és független útvonalakon is. Azért, hogy megbizonyosodjuk az abszcizinsav szerepéről foszfátéheztetés során, vizsgáltuk a prolintartalmat és a prolinszintézisben szerepet játszó gének expresszióját, aba2-3 mutánsban, melyben az aba szintézis blokkolt, valamint abi4 és abi5 mutánsokban, ahol kulcsonfontosságú szignalizációs útvonalak károsodtak. Amíg a foszfátéhezés vad típusú növényekben és az *abi5* mutánsban 3-4 szeresére emelte a prolintartalmat, az *aba2-3* és az *abi4* vonalakban csak kis növekedést regisztrálhattunk. Amikor az említett mutánsokat összehasonlítottuk a vad típussal, az *aba2-3* és *abi4-1* mutánsban a *P5CS1* indukciója csak fele volt a vad típusban mértnek, míg az *abi5* esetében a hajtásban kisebb, a gyökérben határozottabb csökkenést találtunk. A *PDH2* expressziója ezen mutánsok hajtásában nem változott a kezelés során, az *abi4-1* illetve *abi5-1* vonalakban magasabb illetve alacsonyabb értékeket

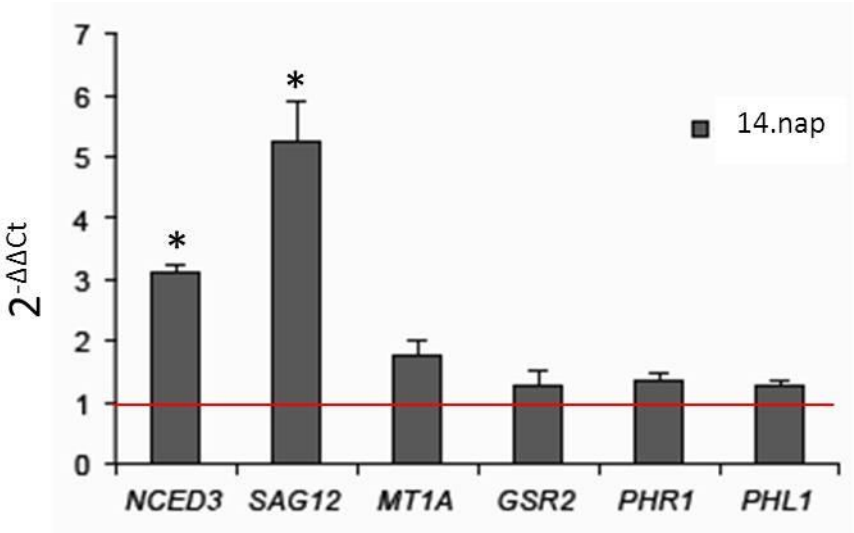
találtunk a vad típushoz képest (20. ábra). Az abszcizinsav bioszintézist a jellemzően szárazság-indukált *NCED3* gén szabályozza, mely a 9-cis epoxikarotenoid szintázt kódolja. Az *NCED3* expressziója foszfátéhezés során megnövekszik (21. ábra), megerősítve azt az elméletet, hogy ez a stressz is serkenti az aszcizinsav bioszintézist. Eredményeink arra utalnak, hogy a foszfátéhezés alatt a *P5CS1* indukcóját és a prolinfelhalmozódást legalább részben ABA-függő szignálok szabályozzák.



20. ábra, Prolinfelhalmozódás és *P5CS1* valamint *PDH2* indukció Arabidopsis Columbia vad tipusú és *aba2-3*, *abi4-1* illetve *abi5-1* mutáns növényekben foszfátéheztetés hatására. (Relatív génexpressziós értékek Pi+=1; a szórások standard hibát jelölnek, a * p<0,05, a ** pedig p<0.005 t-teszt szerinti értékeket, a prolintartalom esetében a kontrollhoz képest, míg az expressziós kísérletben a vad típushoz képest).

Azért, hogy összehasonlítsuk a foszfátéheztetett növényekben keletkező károsodásokat a szeneszcencia során tapsztaltakkal, megvizsgáltuk néhány szeneszcenciához köthető gén (*GSR2, MT1, SAG12*) expressziójának alakulását a

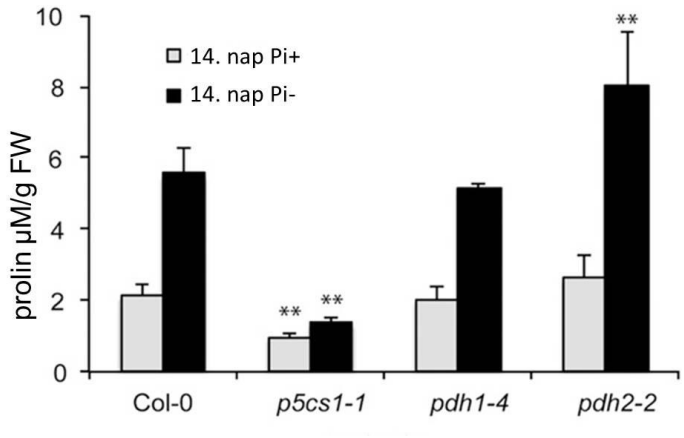
foszfátéheztetés során (21. ábra). A kezelés eredményeként a *SAG12* gén exressziója ötszörösére ugrott meg, míg az *MT1* és a *GSR2* expressziói alig változtak, ezek alapján elképzelhető összefüggés a foszfáthiány okozta károsodások létrejötte és szeneszcencia-függő folyamatok között. Valamint igazoltuk, hogy a *PHR1* és *PHL1* gének expressziója nem változik a foszfátéhezés alatt.



21. ábra, Az *NCED3*-az abszcizinsav szintézis kulcsenzimének génje-, szeneszcencia-kapcsolt gének (*MT1A, GSR2, SAG12*), és a *PHR1*, *PHL1* relatív exressziós szintje 14 nap foszfátéheztetés után. (Pi+=1; * p<0,05)

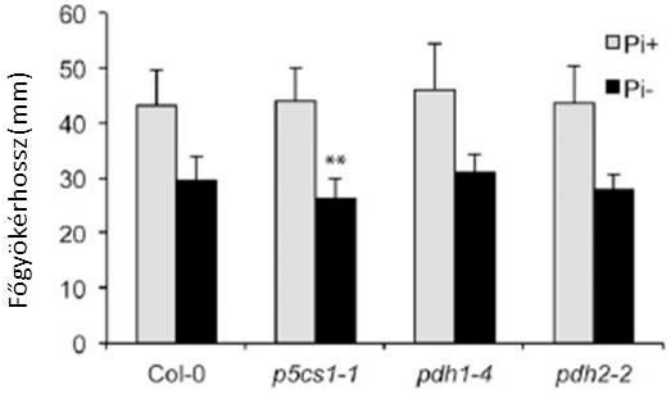
A prolin szerepe a foszfátéhezés során

A *p5cs1-1* mutánsban a foszfátéheztetés hatására nem figyelhetünk meg prolinnövekedést, ami tovább erősítette azt a nézetet, hogy a P5CS1 kulcsszerepet játszik a prolin bioszintézis szabályozásában. A prolinkoncentráció a *pdh1-4* mutánsban hasonló volt, mint a vad típusban a foszfátéheztetés után, míg a *pdh2-2*-ben mintegy 30%-kal magasabb (22. ábra).

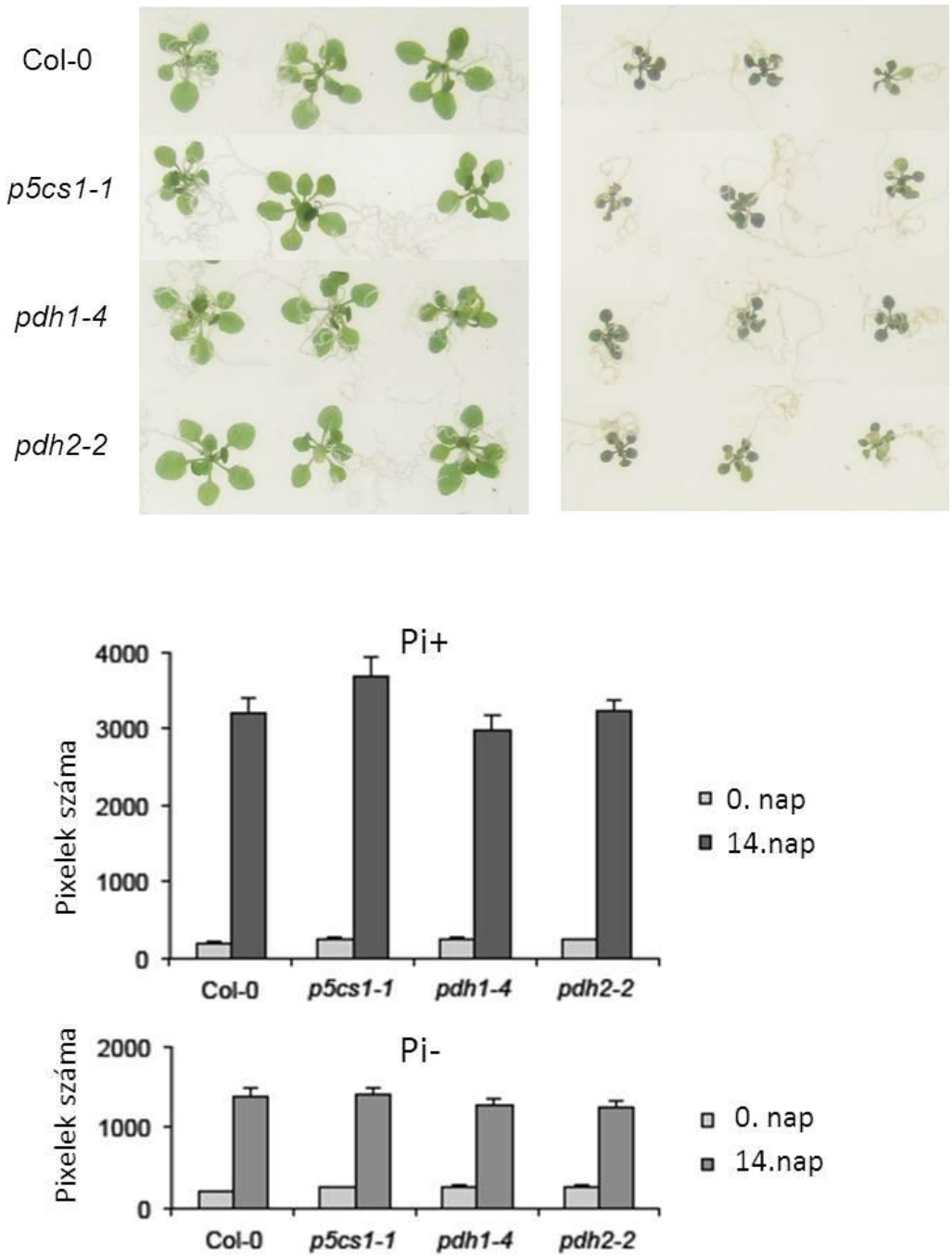


22.ábra, Prolinkoncentrációk változása vad típusban, *p5cs1-1,pdh1-4* és *pdh2-2* mutánsokban Pi+ és Pi- táptalajokon (a szórások standard hibát jelentenek, a ** p<0,005).

Ezután foszfát jelenlétében és hiányában vizsgáltuk az említett *p5cs1-1, pdh1-4* és *pdh2-2* mutánsokban megjelenő fenotípusos változásokat. A gyökérnövekedés kontrol táptalajon mindhárom esetben a vad típushoz hasonlónak bizonyult, viszont foszfát hiányában a *p5cs1-1* mutáns gyökerei kismértékben rövidebbek voltak (23. ábra). A növények rozettáinak növekedése a vad típuséhoz hasonló volt mind kontroll, mind éheztetett körülmények között (24. ábra).

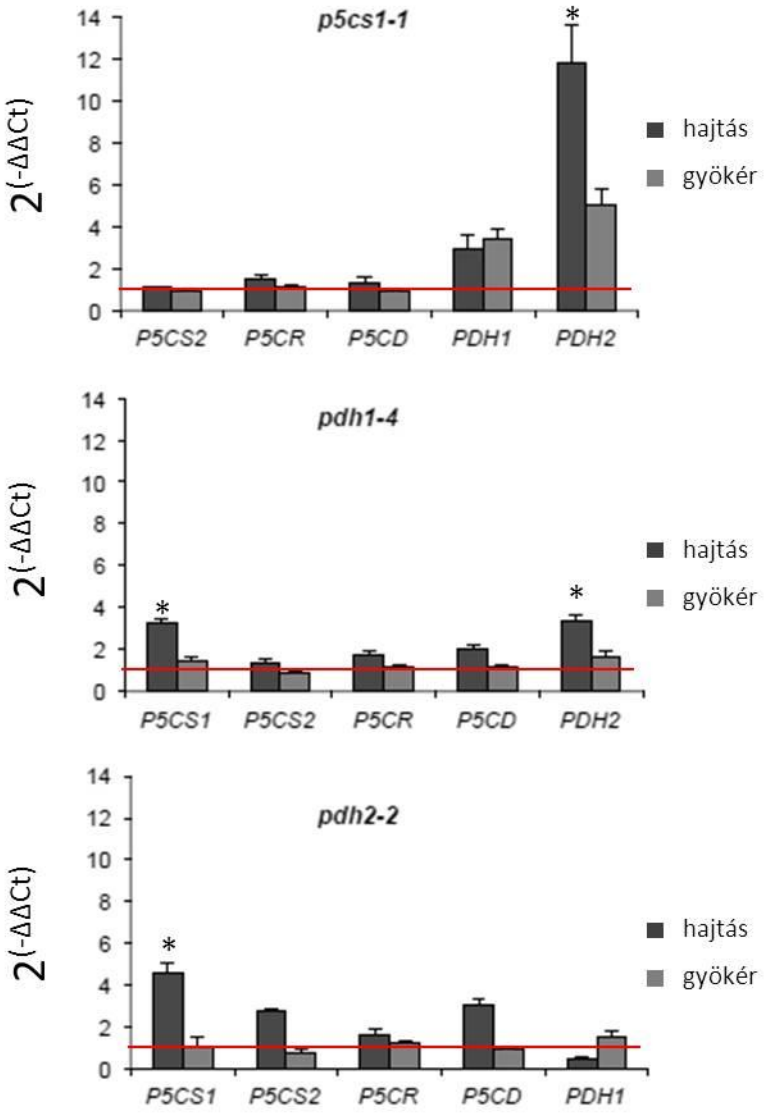


23. ábra, A 14 napos foszfátéheztetés hatása a Col-0 és a prolinmetabolizmus főbb génjeiben (*P5CS1,PDH1,PDH2*) mutáns növények főgyökérhosszára (a szórások standard hibát jelentenek, a ** p<0,005).



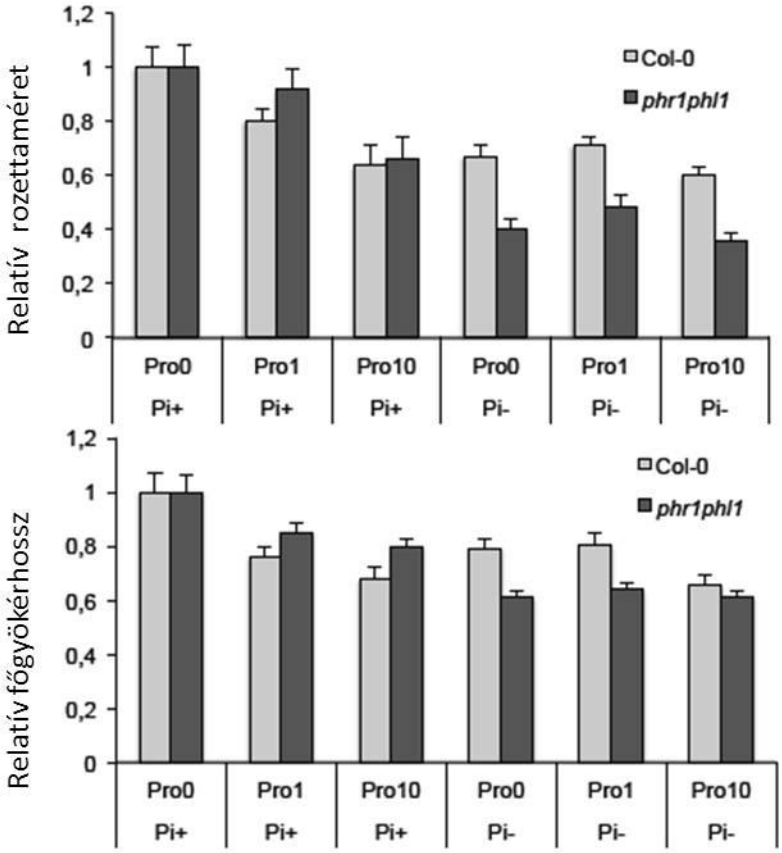
24. ábra, A Columbia, illetve p5cs1-1, pdh1-4, pdh2-2 mutánsok rozettanövekedése Pi+ és Pi- táptalajokon.

A prolinmetabolizmus génjeinek transzkripcióváltozását ezekben a mutánsokban is megvizsgáltuk. A *p5cs1-1* mutánsban az érintett gének transzkripciós válasza hasonló volt a vad típusban tapasztaltakhoz, míg a *pdh1-4* és *pdh2-2* vonalakban a *PDH2* illetve *PDH1* gének expressziója a vad típusénál gyengébb volt (25.ábra).



25. ábra, Génexpressziós változások a foszfátéhezés következtében 14 napig foszfátéheztetett prolinmetabolizmus mutánsokban. Relatív értékek (Pi+=1)

Vizsgáltuk, hogy a táptalajon adott prolin esetén menekíthető-e a növény valamilyen szinten a foszfátstressz okozta károsodásoktól. A táptalajhoz adott prolin (1 és 10 mM) gátolta a vad típus és a *phr1phl1* mutáns növekedését foszfáttartalmú táptalajon. Foszfát hiányában a *phr1phl1* vonal kisebbnek bizonyult, mint a kontroll Columbia, amit a hozzáadott prolin szignifikánsan nem befolyásolt (26. ábra).



26. ábra, A táptalajhoz adott prolin (0-1-10mM) hatása a Columbia és a phr1phl1 mutánsok növekedésére (rozetta és gyökér) Pi+ és Pi- táptalajokon (14 napig éheztetett növények, relatív értékek: Pi+ táptalaj +0mM prolin=1).

Ezekből az eredményekből egyrészt arra következtettünk, hogy foszfátéhezés alatt a megnövekedett prolin bioszintézis ugyan szükséges a gyökérmegnyúlás fenntartásához, de nincs hatása a rozetta növekedésére, másrészt pedig a növényekben megfigyelhető növekedési visszaesés kivülről hozzáadott prolinnal nem állíható helyre.

DISZKUSSZIÓ

A prolinfelhalmozódás az ozmotikus- és sóstressz egy jól dokumentált következménye. A prolinszintézis kulcsenzime a P5CS, amelynek *Arabidopsis thalianában* két izoenzime is ismert; a *P5CS2,* amely háztartási génként funkcionál, míg a *P5CS1* a stresszindukált prolinszintézisért felelős. A növény növekedésének és anyagcseréjének megváltozása stressz esetén egy rendkívül bonyolult, számos egymással közreműködő jelátviteli úton keresztül működő folyamat és ennek fontos része a prolin bioszintézis; mégis kevés olyan faktort ismerünk, ami szabályozza a *P5CS1* kifejeződését, így befolyásolhatja a fehérje mennyiségét. A *P5CS1* többek között só-, és szárazságstresszben is aktiválódik, amelyek súlyos károkat, terméskiesést okoznak napjaink mezőgazdaságában, de nem ismerjük, hogy más fontos problémát jelentő tápanyaghiány esetén milyen szerepet játszik. Célul tűztük ki, hogy azonosítunk olyan, a *P5CS1* promóterével közvetlenül kölcsönható szabályozó elemeket, amelyek befolyásolhatják a gén aktivitását, aminek köszönhetően jobban megérthetjük a gén működését is.

Az élesztő egy-hibrid rendszerben azonosított P5CS1 promóter interaktorok

A *P5CS1* promóterén végzett *in silico* promóter analízis számos feltételezhető illetve már ismert transzkripciós faktor kötőhelyet, valamint kis RNS kötőhelyet is tartalmaz, amelyek jelentős szerepet játszhatnak a gén működésében. Az 5’ nem transzlálódó régióban, számos gén szabályozó régiójához hasonlóan kimutatható a LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) transzkripciós faktor kötőhelye is, mely meghatározó szerepet játszik a fotomorfogenezisben. Munkánk során a *P5CS1* promóter egy 1.9 kbp hosszú szakaszával kerestünk transzkripciós faktorokat élesztő egy-hibrid rendszer segítségével, hogy jobban megértsük a prolinszintézis szabályozását stressz hatására. Sikerült izolálnunk számos igéretes jelöltet, és ezek szabályozó szerepét az alábbiakban ismertetem.

MYB30

A növényi MYB transzkripciós faktorok családja több száz tagot számlál, nevezéktanuk pedig azon alapul, hogy hány MYB repeat-et tartalmaznak. Az általunk az élesztő egy-hibrid kísérletben azonosított a AtMY30B (AT3G28910) a két MYB repeatet tartalmazó csoportjába, azon belül az S1 alcsaládba tartozik. Ezek alkotják a növényi MYB TF-ok legnagyobb csoportját és jelentős szerepet játszanak a növények mikrobiális patogénjei elleni védelmében (Stracke et al.,2001;Dubos et al.,2010). Az *AtMYB30*-at elsőként *Xanthomonas campestris*-szel fertőzött növényből készült cDNS könyvtárból izolálták. Különböző avirulens baktériumokkal történő kezelések után a hiperszenzitív reakció (HR) megjelenése előtt specifikus korai tranziens *AtMYB30* aktivációt figyeltek meg. (Daniel et al.,1999). Dohányban és Arabidopsisban kimutatták, hogy az AtMYB30 túltermeltetése a HR felgyorsulásához, intenzívebbé válásához vezet. Ezen felül megnövekszik a HR molekuláris markereinek akkumulációja illetve ezzel együtt a növény rezisztensebbé válik az avirulens patogénekre. Ennek ellenpontjaként az antiszensz technológiával represszált *AtMY30* a HR erős visszaeséséhez vezetett (Vailleau et al.,2002). Az ismert adatok alapján a növényi patogéntámadás esetén az AtMYB30 a programozott sejthalált indukáló jelátviteli utak pozitív szabályozója. Az AtMYB30 feltételezett célgénjei között olyan géneket is találunk, amelyek a lipid bioszintézisben vesznek részt és a nagyon hosszú láncú zsírsavak (VLCFA-k) termelésében játszanak szerepet (Raffaele etal.,2008). A VLCFA útvonal későbbi termékei között viasz és kutin mellett szfingolipideket is találunk melyek jelmolekulaként funkcionálhatnak a programozott sejthalál folyamatában. Az AtMYB30 az abszcizinsav jeláltviteli utakban pozitív regulátornak bizonyult a növényi stresszfolyamatok során. Ábrahám és mtsai (2003) az abszcizinsavat a prolinakkumuláció pozitív szabályozójaként írja le, ami egyfajta megerősítése annak, hogy a MYB30 valóban tagja lehet *in vivo* ennek a reakcióútnak. A MYB30-nak a brasszinoszteroid (BR) jelátvitelben is fontos szerepe van azáltal, hogy serkenti a BR célgénjeinek expresszióját

Mustang-3

A Mustang (MUG) géncsalád tagjai domesztikálódott transzpozonok, amelyek fontos szerepet játszhattak a virágos növények evolúciójában, és mára konzerválttá váltak a zárvatermők között. A transzpozábilis elemekről általánosságban elmondhatjuk, hogy fennmaradásuk autonóm replikációjuknak köszönhető, nem pedig annak, hogy az adott organizmus számára hasznos tulajdonságot jelentenek (Doolittle et al 1980.). Igaz ugyan, hogy ezeknek az elemeknek egy funkcionáló génbe való beépülése adott esetben pozitívan járulhat hozzá az élőlény fitness-éhez, de ezidáig kevés elemről sikerült bebizonyítani azt, hogy önmagukban is funkcióval rendelkeznek, illetve a növény számára előnyös tulajdonságok kialakításában vesznek részt, A Mustang mellett ismert domesztikálódott transzpozábilis elemek pl a FHY3 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3) transzkripciós faktor család tagjai amelyeknek rendkívül jelentős szerepe van cirkadián óra szabályozásában (Hudson et al 2003.). A FHY3 a fényjelátvitel számos területén kölcsönhat a HY5 transzkripciós faktorral, melynek kötése a P5CS1-hez annak 5’ UTR régióján bizonyított.

A MUSTANG transzkripciós faktorok közül az élesztő egy-hibrid kísérletünkben a MUSTANG 3-at (MUG3: AT1G06740) azonosítottuk, mint potenciális kölcsönható partnert. A különböző knockout *mug* mutánsok növekedése, feljődése és reprodukciós képességei jelentősen elmaradnak a vad típushoz képest. Egyes mutánsok a vad típushoz képest kevesebb klorofillt tartalmaznak, részben ezért a szénhidrát anyagcseréjük jelentős mértékben károsodott, így kizárólag *in vitro* hozzáadott szaharóz jelenlétében életképesek (Smith et al 2007.). Más mutánsok növekedése és reprodukciója gátolt. Hiányosságot mutatnak a virágzati szervek fejlődésében, a termékenységben és a reprodukció időzítésében is. Ezek a növények kevés vagy semennyi pollent nem termelnek, a porzóik és a termőjük nem nyúlik meg úgy, ahogy a vad típusban, megakadályozva ezzel az önmegporzást. A termőtájuk felépítése is módosul, így akkor is nehezen termékenyülnek meg, ha a pollen eljut a termőpapillához (Joly-Lopez et al 2012.). Amennyiben megfigyelhető lenne egyfajta redundancia a két leginkább ismert domesztikálódott transzpozon funkciójában, érdekes lehet utánajárni, hogy vajon a stresszreakciók jelátvitelében is szerepet játszanak-e.

Indetermined Domain-5

Az Indetermined Domain-5 (IDD5: AT2G02070) egy Cink-ujj domént tartalmazó, C2H2-szerű transzkripciós faktor. Kimutatták hogy pozitív regulátora a keményítő-szintáz 4 (*STARCH-SYNTHASE 4*, *SS4*: At4g18240) génnek. Ezáltal szerepet játszik a kloroplasztisz fejlődésében, morfológiájának kialakulásában illetve befolyásolja benne található keményítőszemcsék számát és kialakulását. Ingkasuwan és mtsai (2012.) kutatásai alapján az IDD5 tagja egy olyan rendkívül összetett keményítő termelést szabályozó hálózatnak, amely szoros kapcsolatban áll egyes óragénekkel (*CCA1*: At2g46830, *LHY*: At1g01060) és a keményítő napi körforgásának alakulását határozzák meg. IDD5-öt leírták, mint DELLA interaktort is. Ezek a fehérjék szabályozzák ozmotikus stressz esetén a növény növekedésének gátlását, az abszcizinsav stabilizálja őket, míg lebontásukat gibberellinek irányítják (Achard et al., 2006; Golldack et al., 2013).

BROTHER OF LUX ARRHYTHMO

Az Arabidopsis BROTHER OF LUX ARRHYTHMO (BOA: AT5G59570) a GARP transzkripciós faktor családba tartozó fehérje (Hazen et al. 2005.), melyet a cirkadián ritmus regulál. A cirkadián rendszer számos élettani és anyagcserefolyamat szabályozásában vesz részt, és jelentős szelekciós előnyt jelent az organizmus számára. A biológia oszcillátorok lehetővé teszik, hogy a növények alkalmazkodni tudjanak a környezet napi változásaihoz, úgy mint a nappal-éjszaka ciklus és az ezzel járó fény-, és hőmérsékleti változások. Az Arabidopsis cirkadián óra legkorábban leírt tagjai a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1; AT2G46830) and LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY AT1G01060.1) (McClung 2008.), a BOA és az említett két gén közvetlenül részt vesznek egymás szabályozásában. A BOA túltermelése transzgenikus növényekben többféle élettani és fejlődésbeli különbséget eredményez, többek között késleltetett virágzást és a vegetatív szervek intenzívebb növekedését is. Egy rendkívül fontos cirkadián óra protein a CCA1 a BOA promóterén található “evening element”-hez kötve gátolja a génkifejeződést. A BOA-ról pedig *in vitro* és *in vivo* is kimutatták, hogy

képes bekötni a *CCA1* promóteréhez és aktiválja a transzkripciót, így ez a két gén egyfajta visszacsatoló hurkot alkot (Baudry and Key 2008.). A *cca1, lhy1* szimpla és dupla mutánsokban megfigyelték, hogy a BOA napi periódusideje megrövidült. BOA túltermelő mutánsokban viszont a CCA1 periódusidejének meghosszabbodását figyelték meg. Ezen felül a BOA túltermelése hatással van más óragének, többet között az *LHY*, *GIGANTEA* és a *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (TOC1) expressziójára is. Összességében a BOA kulcsfontosságú szereppel bír a cirkadián óra szabályozásában. Gibon és mtsai (2006) a prolintermelés napi ritmusát írják le, mely a nappak késői fázisában tetőzik, elméletem szerint a BOA ebben játszik jelentős szerepet.

Phosphate Starvation Response1 és Phosphate Starvation Response-like1

Az élesztő egy-hibrid kísérleteinkben a Phosphate Starvation Response 1 (PHR1 AT4G28610) transzkripciós faktort egy, míg a vele funkcióját tekintve nagyban átfedő Phosphate Starvation Response Factor 1 –like-ot (AT5G29000) négy kópiában találtuk meg, mint potenciális *P5CS1* promóterrel kölcsönható partnert. A PHR1-et *Arabidopsis*-ban a foszfáthiány során fellépő, annak káros hatásainak kivédésére irányuló élettani folyamatok elsődleges szabályozójaként írták le(Bustos et al 2010.).A foszfát esszenciális makroelem az élőlények számára. Alapvető építőköve többek között nukleinsavaknak, ATP-nek és foszfolipideknek is. A P közvetlenül kapcsolódik energiaátmenetekhez, számtalan anyagcsere intermedier képződéséhez és fehérjék poszttranszlációs módosításához is (Poirier and Bucher, 2002). Hiányában a növények növekedésében és fejlődésében is jelentős változások következnek be, ilyen pl. a hajtásnövekedés csökkenése és antociánok akkumulációja. A növények a foszfátot szervetlen foszfát formájában veszik fel a talajból. A talaj foszfáttartalma heterogén és a gyökérzet által elért talajrégióban gyakran nagyon alacsony. (Poirier and Bucher, 2002). A Pi hiányra gyökérszerkezet szintjén a növény a főgyökér növekedésének gátlásával és az oldalgyökerek és gyökérszőrök növekedésének serkentésével válaszol annak érdekében, hogy minél nagyobb talajfelületet érjen el, megnövelve ezzel a foszfátfelvétel kapacitását. A foszfáthiány érzékelése után a növény válasza génexpressziós szinten a

Bevezetésben ismertetett PHR1-PHO2–miRNA399 kaszkádon (Briat et al 2015.) keresztül valósul meg.

A PHR1-et kezdetben a Pi homeosztázis legfőbb transzkripció regulátoraként tartották számon. Napjainkban azonban több tanulmány is arra utal, hogy a PHR1 olyan gének expresszióját is szabályozza, melyek szükségesek a S, Fe és Zn transzporthoz és ezen elemek homeosztázisának fenntartásához (Bournier et al. 2013; Khan et al., 2014.), összekötve ezek anyagcseréjét a foszfátanyagcserével. Így a PHR1 az első molekuláris kapocs, amely összeköti a mikro és makroelemek szabályozó útvonalait. Ezen felül leírták a PHL1 aktiválódását sóstressz, ozmotikus stressz és ABA kezelés hatására is (Kilian et al 2007.), ami tovább terjeszheti ezen transzkripciós faktorok szerepét más abiotikus stresszek kutatása tekintetében is.

Ismerjük, hogy a növényi sejtek kénhiány esetén a szulfolipidek foszfolipidekre, foszfáthiány esetén a foszfolipideket szulfolipidekre cserélik, ez igazolja a növényekben a P és S szintjének egymástól való függőségét. Érdekes módon a foszfolipidek szulfolipidekre cserélésének két génje az SQD1 (AT4G33030) és az SQD2 (AT5G01220) promóterében is találunk P1BS helyet, valamint mindketten upreguláldódnak a PHR1 hatására. Nagyon alacsony mennyiségű inozitol-6-foszfátot szintetizálni képes mutánsokban a szulfát és Pi transzportban, illetve jelátvitelben részt vevő gének expressziója megváltozik, így azt feltételezik, hogy ez a molekula lehet az összekötő kapocs a két útvonal között. (Belgaroui et al.,2014).

A növényekben a vas és a foszfát homeosztázisának kapcsolata ismert (Hirsch et al., 2006; Ward et al., 2008). A Pi a talajban komplexet alkot a vassal (Fe^{2+}), ami precipitátum képződéséhez vezet, megnehezítve ezzel a növények számára ezeknek az elemek elérhetőségét. Ennek következményeként a gyökérben a Fe hiány esetén nagy affinitású Fe^{2+} felvételi rendszer aktiválódik akkor is, amikor foszfáthiány lép fel. (Ward et al.,2008). Ezzel összefüggésben a növényekben a foszfátéhezés serkenti a fém - főleg Al és Fe-akkumulációt (Ward et al., 2008). Fejlődéstani szempontból pedig szintén jól dokumentált, hogy a Pi- éhezéskor tapasztalt főgyökér-gátlás részben Fe toxicitásnak köszönhető (Ward et al., 2008). A Fe-t raktározó AtFER1(AT5G01600) gén promóterében szintén megtalálható a P1BS hely, amelyhez a PHR1 és PHL1

hozzákötődnek, ugyanakkor a foszfátéhezés esetén a ferritin indukciója nem függ a rendelkezésre álló Fe mennyiségétől(Bournier et al., 2013).

Napjaink mezőgazdaságában a foszfáthiány jelentős károkat okoz. Az, hogy a Y1H kísérletben a két faktor összesen 5 találatot adott, valamint az lehetőség, hogy összefüggést találunk egy ilyen aktuális probléma, illetve egy ilyen jól definiált, de ebben az aspektusban még nem vizsgált mechanizmus, mint a stresszindukált prolinszintézis között, arra ösztönzött minket, hogy kísérleteinket ebbe az irányba folytassuk tovább.

A P5CS1 promóter és a PHR1-PHL1 transzkripciós faktorok kötésének bizonyítása

Első lépésként megerősíteni kívántuk az élesztő egy-hibrid kísérletben a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorokkal kapott eredményeinket. Ezért egyfelől electromobility shift assay-jel (EMSA) vizsgáltuk a *P5CS1* promóter fragment és az *E. coli*-ban termeltetett PHR1 és PHL1 fehérjék közötti kapcsolatot. A kísérleteinkkel nemcsak megerősítettük, hogy ez a két TF kötődik a P5CS1 promóteréhez, hanem azt is kimutattuk, hogy a kötődés a P1BS kötőhelyhez kapcsolható. Az EMSA kísérletek során azt is tapasztaltuk, hogy a vizsgált két fehérje eltérő affinitással rendelkezik a P1BS-t tartalmazó fragmentre. A promóter fragment gélbeni migrációja 0,25 µg PHR1 hozzáadása esetén szemmel láthatóan már megváltozott, és 1µg fehérje esetén a kontroll-kiindulási - mérettartományban már nem kaptunk jelet . A PHL1 esetében 0,5 µg fehérje mellett látunk határozott shiftet a DNS gélbeni migrációban, míg annak teljes áthelyeződéséhez 1,5 µg PHL1 fehérjével történő együttinkubálás szükséges. A kísérlet összességében tehát azt mutatja, hogy a PHR1 *in vitro* nagyobb affinitással rendelkezik a P1BS-t tartalmazó DNS fragmenthez, mint a PHL1.

A kölcsönhatást megvizsgáltuk *in vivo* módszerrel is. Ehhez kromatin immunoprecipitáció módszerét használtuk influenza hemagglutininnel (HA) jelölt PHR1-et termelő transzgenikus Arabidopsis növények bevonásával. Ezeket a növényeket 2,5 mM foszfátot tartalmazó táptalajon csíráztattuk, majd az 5. napot követően áthelyeztük őket foszfát mentes táptalajra illetve kontrollként az addig használt, foszfátot is tartalmazó táptalajra és további 14 napig neveltük így őket Az eredmények értékelése során mindkét

precipitátumban, illetve egy precipitáció nélküli, ún. “input control”-ban összehasonlítottuk a kötőhelyet tartalmazó amplikon mennyiségét a kötőhely nélküli *P5CS1* fragment mennyiségével és azt tapasztaltuk, hogy a HA-ellenanyaggal precipitált mintában a kötőhelyet tartalmazó fragment a kontroll fragmenthez képest hétszeres mennyiségben detektálható, míg a GFP-vel precipitált, valamint az “input control” mintánkban nem láttunk különbséget az említett két fragment mennyisége között. Ez alapján megállapíthattuk, hogy a PHR1 *in vivo* is képes kötődni a *P5CS1* promóterhez, mégpedig specifikusan a P1BS kötőhelyhez. Figyelemre méltó, hogy az említett PHR1 és PHL1 kötő hely a gén első intronjában található. Az intronok transzkripciót elősegítő szerepét számos esetben leírták már, gyakran akkor, ha közel helyezkednek el a transzkripciós start helyhez. A növényvilágban pl. a LEAFY és WUSCHEL transzkripciós faktorok együttműködnek az *AGAMOUS* gén aktiválásában úgy, hogy hozzá az *AG* első intronján lévő kötőhelyen át kapcsolódnak. A nagy affinitású foszfát transzporter *PHT1.4* gén első intronjában is megtaláljuk a P1BS helyet, amely rendkívül jelentősnek bizonyult a gén gyökérben történő nagyarányú kifejeződéséhez foszfátéhezés alatt.

A prolinszintézis alakulása és annak háttere foszfátéhezés alatt

Vad típusú *Arabidopsis thaliana*-ban (Col-0) a a szabad prolin koncentrációját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a növényekben a 14 napos foszfátéheztetés során, annak 4. napjától már eltérések mérhetők, mely az éhezés során lineárisan növekszik. A hetedik napon tapasztalt kétszeres különbség a kísérlet időtartama alatt folyamatosan emelkedett, annak végére pedig a kontroll - nem éheztetett - növényben mérhető érték közel négyszeresét érte el, amit egy jelentős változásként könyvelhetünk el. A lineáris növekedésnek a foszfáthiány mellett okozója lehet a másodlagos stresszként megjelenő reaktív oxygen formák akkumulációja is. Megvizsgáltuk ugyanekkor a feleslegben (10mM) hozzáadott foszfát hatását is, azonban ebben az esetben semmiféle különbséget nem tapasztaltunk a kontrollhoz képest. Génexpressziós tekintetben azt tapasztaltuk, hogy a *P5CS1* expressziója foszfátéheztetés során mind gyökérben, mind a hajtásban jelentős (2,5 illetve 4-szeres) emelkedést mutatott a kontrollhoz képest, ami egybevág a prolinkoncentrációt szemléltető adatokkal. A *prolin dehidrogenáz 2* (*ProDH2*) szintén egy jelentős stresszindukált gén, mint ahogy erre másik elnevezése (*ERD2 - Early Response*

Dehydrogenase 2) is utal. Ennek expressziójára is serkentőleg hatott a foszfátéhezés, ami a kontroll mintákhoz képest 3-szoros (hajtásban) illetve 7-szeres (gyökérben) növekedésben nyilvánult meg. A többi általunk vizsgált prolinmetabolizmusban részt vevő gén (*P5CS2, P5CR, P5CDH, ProDH1*) expressziója nem változott számottevően. A megemelkedett *P5CS1* és *PDH2* expresszió azt sejteti, hogy a foszfátéheztetett növényekben megemelkedett a prolin turnover. Ez a jelenség jótékony hatással lehet a NADP/NADPH arány és a sejt redox állapotának szabályozása szempontjából a stressz során azáltal, hogy a prolin bioszintézishez redukáló energiát használ fel és/vagy a prolin oxidációján keresztül energiát biztosít a mitokondriális enegriatranszport számára. Láthattuk a prolintartalom erőteljes növekedését a vad típusban, ugyanakkor *p5cs1-1* mutánsban a foszfátéhezés nem vált ki ilyen hatást, ellentétben a *pdh2-2* vonallal, ami viszont a *Columbiá*-nál szignifikánsan több prolin akkumulált, ezzel is alátámasztva azt, hogy ez a két gén határozza meg a prolinszintet ezen stresszkörülmények között is. A prolin funkciója a foszfáthiány esetén ugyanakkor ellentmondásos, hiszen a hozzáadott prolin nem okoz látható változást a növény növekedésében foszfáthiányos táptalajon. Ezzel ellentétben a *p5cs1-1* mutánsban a prolinfelhalmozódás képességének hiánya hiperszenzitivitást okoz só- és szárazságstresszre (Sharma et al 2011.), ezzel utalván arra, hogy a prolinnak fontos védelmi funkciója van az említett körülmények között.

A foszfátéhezés jellemző élettani tüneteit a mi kísérleti körülményeink között is megtapasztaltuk. A főgyökér növekedésének gátlása és az oldalgyökérképződés serkentése egyaránt szembeöltő volt. Ezzel párhuzamosan GFP-vel jelölt P5CS1-et tartalmazó vonalon mikroszkóposan nyomon követtük a P5CS1 akkumulációját, illetve eloszlását a gyökérzetben. Kontrol körülmények között a főgyökér csúcsában gyenge P5CS1-GFP fluoreszcenciát tapasztaltunk, míg az éheztetett növényekben a főgyökérben annak növekedésgátlásával együtt a GFP-jel is csökkent. Erős GFP jel volt viszont megfigyelhető az újonnan képződött oldalgyökerek csúcsában, illetve azok eredésénél vagyis az intenzívebben osztódó területeken. A P5CS1-GFP fehérje a gyökérben a foszfátéhezés hatására generálisan az egész gyökér hosszában megemelkedik Ward és mtsai (2008.) arról írnak, hogy a foszfáthiány következtében fellépő gyökérnövekedés gátlás tulajdonképpen nem is egyedül a foszfáthiánynak, hanem az emiatt fellépő Fe toxicitásnak az eredménye, ugyanis a foszfát nagyon sok

esetben a vassal komplexben található meg a talajban, amit a növény nem képes felvenni, így normál körülmények között nem toxikus. Elképzelhetőnek tartom azt, hogy a táptalajban található 50µM Fe-EDTA nehézfémstresszt és ebből eredő ROS-akkumulációt okozott a növény teljes gyökérzetében, ez pedig egy olyan jelenség amiben a prolin védőszerepét és a P5CS1 indukcióját már ismerjük. A főgyökér növekedésének gátlásával és az oldalgyökérképződés serkentésével a növény arra törekszik, hogy képes legyen minél nagyobb talajfelülettel érintkezni és annak foszfátkészletének kihasználásával elhárítani a stresszt. Kísérleti rendszerünkben a *Col-0* növények főgyökerének hossza a foszfátéheztetés lejártával 45%-kal rövidebbnek bizonyult a Pi+ táptalajon nőtt növény gyökerénél. A P5CS1-GFP sejtbeli lokalizációjában nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és az éheztetett növények között. A P5CS1 akkumulációját Western blot analízissel is kimutattuk és azt találtuk, hogy míg kontroll körülmények között a P5CS1-GFP mérettartományában nem tudtunk jelet detektálni, a foszfátéheztetett növény esetében az indukció erőssége megfelelt egy 3 napon át 75 mM NaCl-on nevelt növényben tapasztalható P5CS1-GFP szintnek.

A foszfátéheztetett növények hajtásait vizsgálva levelek fakulásával, illetve antociánok akkumulációval találkoztunk. Az ATP és a NADP, mint az energiaátmenetek kulcsmolekulái a foszfáthiány miatt nem képesek megfelelő mennyiségben szintetizálódni, ezáltal a növény nem tudja a beérkező fotonok száma által meghatározott fotoszintetikus kapacitást fenntartani; ennek következménye pedig fotoinhibíció, illetve reaktív oxigénformák megjelenése lesz. A felhalmozódó antociánok egyrészt elnyelik a beérkező fotonok egy részét, megvédve ezzel a fotoszintetikus apparátust, másrészt fontos szerepük van a keletkezett szabadgyökök kioltásában is. A növények hajtását vizsgálva megállapítottunk, hogy a 14 napos foszfátéheztetés hatására a rozetták növekedése 40%-kal csökkent a kontrollhoz képest. Molekuláris szinten a foszfáthiány miatt egyes anyagcsereutak károsodnak és reaktív oxigén formák halmozódnak fel. Kísérleti rendszerünkben az éheztetett növényekben 4-7-szer magasabb H_2O_2 szintet, illetve közel kétszeres lipid peroxidációt tudtunk detektálni a kontrolhoz képest.

A phr1, phl1 és phr1phl1 mutánsok prolinakkumulációja

A következő lépésben *phr1* és *phl1* szimpla és *phr1phl1* dupla mutáns növényeket vizsgáltunk foszfátéhezés alatt azért, hogy információt kapjunk ezeknek a transzkripciós faktoroknak a prolinmetabolizmusra gyakorolt hatásáról, ezt megelőzően pedig vizsgáltuk a foszfátéhezés fenotípusos hatásait az említett vonalakban. 14 nap foszfátéheztetést követően a kontrollként használt teljes táptalajon mindhárom mutáns vonal a Columbia növényekhez hasonló növekedést mutatott. A vad típus és a *phl1* növekedése a foszfátmegvonás hatására közel 50%-kal esett vissza, míg a *phr1* és a *phrphl1* ezeknél szignifikánsan jobban, ami a PHR1-nek a PHL1-nél jelentősebb szabályozó szerepére utal. Kontrol körülmények között mindhárom mutánsban a vad típussal közel megegyező prolinszintet mértünk, míg a foszfátéhezés csak fele akkora indukciót eredményezett, mint a Columbiában, ez arra utal, hogy a foszfátstressznek a prolinszintézis indukáló hatása is része a PHR1 szignalizációs útvonalának. Megmértük az említett mutánsokban a prolin akkumulációjának mértékét sókezelést követően is. Ez mindhárom mutánsban erőteljes prolin akkumulációt eredményezett, amelynek értéke minden esetben kevesebb volt a vad típusban mérhetőnél, ami a szimpla mutánsok esetében a vad típus értékének 75-80%-át, míg a dupla mutánsban annak 60%át jeletette. Ez egyfelől megmutatja, hogy a PHR1 és PHL1 funkcionálisan redundánsok és talán talán feltételezhetjük azt is, hogy ezek a transzkripciós faktorok nem csupán az eddig leírt tápanyaghiányok jelentette stressz során, hanem sóstressz esetén is funkcióval bírnak. Ezt követően a prolinmetabolizmusban szerepet játszó gének expressziós vizsgálata azt mutatta, hogy a foszfátéheztetés után a vad típusban tapasztalható *P5CS1* indukció a mutánsokban jelentősen lecsökkent. A *PDH2* expressziós értékei a gyökérben a P5CS1-hez hasonlóan a nem érték el vad típusban tapasztalt indukció mértékét, a hajtásban ugyanakkor ahhoz hasonlónak bizonyultak. Azok a gének, melyeket a vad típusban nem mutattak expressziós különbséget, itt sem változnak. A mi eredményeikkel tőlünk független transzkriptóm adatok is egybevágnak. Bustos és mtsai (2010.) is leírják, hogy microarray analízisükben foszfátéheztetett Arabidopsisban a *P5CS* (itt együtt a 2 izoforma), illetve a *PDH2* expressziójának növekedését tapasztalták, míg más prolinmetabolizmusban

érintett gén kifejeződése nem változott. Kísérleteink során igazoltuk azon irodalmi adatokat, melyek szerint a *PHR1* és *PHL1* expressziója nem változik meg a foszfátéheztetés során, viszont a mutánsokban látott *P5CS1* és *PDH2* kifejeződési eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a fent említett két transzkripciós faktor elengedhetetlen a foszfáthiány során végbemenő génexpressziós változásokhoz.

Az abszcizinsav jelátviteli út a foszfátéhezési válaszreakciókban is szerepet játszik

Az abszcizinsavról ismert, hogy szabályozza a prolinfelhalmozódást só és ozmotikus stressz hatására A *phr1phl1* mutánsokban az ABA kezelés kevésbé emelte meg a szabad prolin szintet, mint a vad típusban, hasonlóan a foszfátéheztetéshez és a sóstresszhez. A prolinfelhalmozódás és a *P5CS1* transzkript szintje alacsonyabbnak bizonyult az ABA szintézis mutáns *aba2-3* és az ABA inszenzitív *abi4-1* mutánsban a foszfátéhezés alatt. Az ABI4 egy AP2 típusú transzkripciós faktor ami számos ABA által szabályozott gén transzkripcióját irányítja, valamint szerepet játszik a cukor-jelávitelben is (Finkelstein 2013.). Eredményeink azt sejtetik, hogy ABA-függő szignálok aktiválják a prolin bioszintézis útvonalat nem csak dehidratáció, hanem foszfáthiány esetén is.

Az ABA szabályozás és a foszfátéhezés kapcsolata nem csak a prolinmetabolizmus jelenségén keresztül esik egybe. Transzkriptomikai adatok szerint számos ABA által szabályozott gén aktiválódik foszfátmegvonás alatt is, ilyenek pl az *RD29a, RAB18, RD20,RD22,P5CS1/2, XERO2* valamint az *NCED3* ami kulcsregulátora az ABA bioszintézisnek. Az *NCED3* transzkripciója a mi kísérleteinkben is indukálódott a foszfátéhezés hatására. Néhány ABA jelátviteli gén is (pl A*BI1, ABI2, HAB1, OST1, ABF3, MYB2, MYC2, RAP2.12*) indukálódik foszfátéheztetésalattés ezek kifejeződése gátlódik *phr1* és *phr1phl1* dupla mutánsokban (Bustos et al., 2010.), ami arra utal, hogy az ABA-regulon egy része PHR1 és PHL1 faktorok által is szabályozott. Transzkripciós adatok igazolják azt is, hogy a PHL1 transzkripciós faktor indukálható sóval, ozmotikus stresszel és ABÁ-val is. Számos foszfátéheztetésre reagáló génről bebizonyosodott, hogy más stresszformák, pl. hideg, szárazság, sóstressz, valamint patogének, illetve hormonok, pl. ABA és etilén által is aktiválódnak. Ezek az eredmények egy közvetlenebb kapcsolatra utalnak az ABA jelátvitel és az éhezés anyagcsereútjai között, ezek

együttesen szabják meg a foszfáthiányra adott válaszokat. Az ABÁ-ról ismert, hogy serkenti a védelmi mechanizmusokat szárazság illetve magas sótartalmú talaj esetén és szabályozza a növekedésgátlást. Azt találtuk, hogy foszfáthiányos táptalajon az ABA-deficiens *aba2-3* mutáns rozettanövekedése kevésbé visszafogott, mint a vad típusé, utalván arra, hogy az abszicinsavra szükség van a növekedés gátlásához ennél a stressznél is. Az ebben a mutánsban megfigyelhető levélfakulás viszont azt mutatja, hogy az ABÁ-ra szükség van a életképesség fenntartásához a fosztfátéhezés során. Az *aba2-3*-mal ellentétben a *phr1phl1* mutánsban mind a növekedés, mind az életképesség csökkenését figyelhettük foszfát hiányában. Ezekben a mutánsokban a csökkent prolinakkumuláció valószínűleg nem felelős a növekedésgáltásért és a fakulásért, ugyanis a *p5cs1-1* mutáns, amelyben egyáltalán nem folyik stresszindukált prolinszintézis, nem mutatja ezeket a tüneteket. Az ABA szintézis blokkolásáról tudott volt, hogy feloldja a gyökérnövekedés gátlását mérsékelt ozmotikus stressz esetén, alátámasztva azt a megfigyelésünket, hogy az ABÁ-nak szerepe van a növekedés szabályozásában stressz alatt. Az ozmotikus stressz alatt a növekedés gátlást DELLA proteinek szabályozzák, ezek stabilizálásában is részt vesz az ABA. Fontos megemlítenem, hogy a P5CS1 promóter egyik azonosított kötő transzkripciós faktora, az Indetermined Domain-5 (IDD5) az irodalmi adatok alapján DELLA fehérje kölcsönható is (Achard et al., 2006; Golldack et al., 2013). Eredményeink felfednek egy eddig nem ismert kapcsolatot a foszfát és prolinmetabolizmus között. A *P5CS1* gén szabályozza a prolin bioszintézist és középpontja, célponta lehet az abszcizinsav jelátvitelnek és a foszfát homeosztázis szabályozásána;, és ezt a MYB típusú PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok szabályozzák

A foszfátéhezésre adott válasz összetett fény és hormonális szabályozás alatt is áll

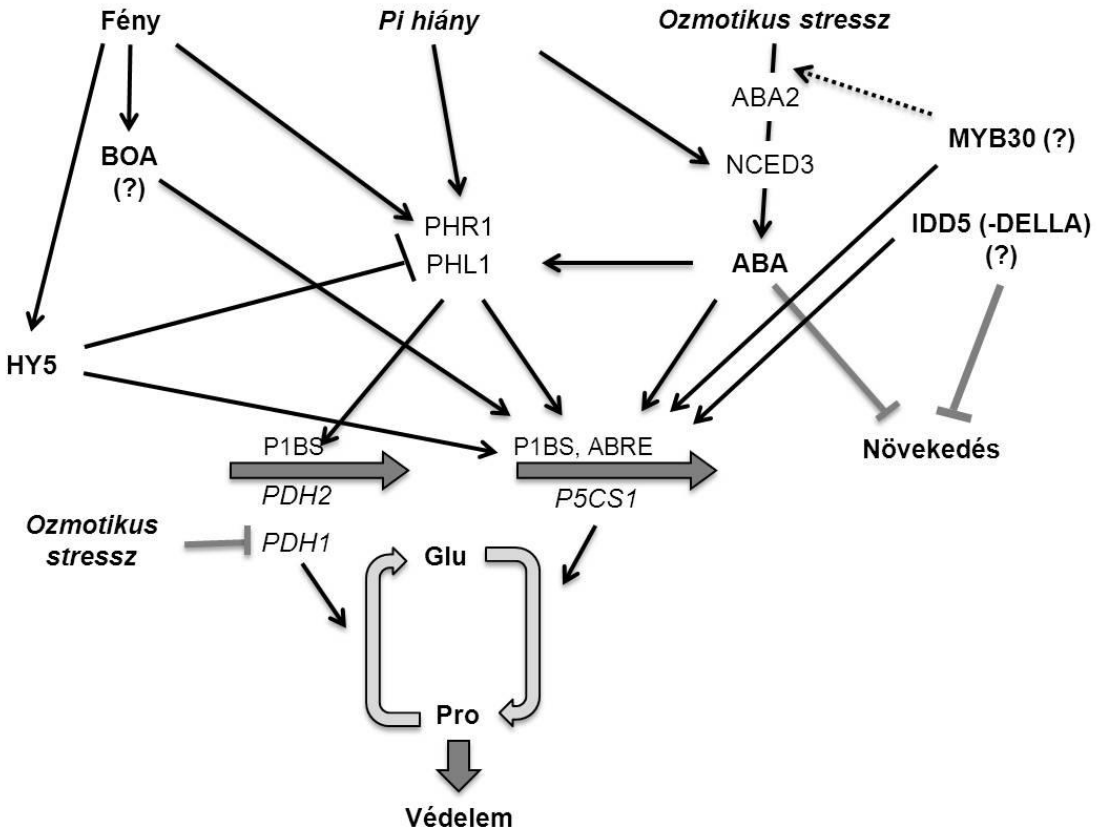
Ábrahám és mtsai (2003.) leírták, hogy sötétadaptált növényekben a prolinakkumuláció gátolt, sejtetve azt, hogy a fény jelátvitel, vagy valamiféle fényfüggő metabolikus vagy hormonális szignál szerepet játszik a prolinmetabolizmus szabályozásában. Ha összehasonlítjuk a nyugalmi állapotban lévő *P5CS1* transzkript szintet fényben növő és sötétadaptált növények között, akkor azt látjuk, hogy a fény esszenciális a transzkripcióhoz mind alap, mind indukált állapotban. A P5CS1-gyel ellentétben a *P5CS2* esetében kevésbé szembetűnő a változás. A *P5CS1*-el ellentétben a sötétadaptáció a hajtásban serkentőleg hat a *PDH* gének expressziójára.

Feng és mtsai 2016-ban publikálták, hogy a fény befolyásolja a *P5CS1* sóstressz-indukált memóriáját. Ezt a jelenséget a H3K4 háromszoros metiláltsági állapotától teszi függővé, aminek megléte esszenciális a transzkripciós memóriához (TMP-Transcriptional memory of *P5CS1*). Ennek a metiláltsági állapotnak a fenntartásában a HY5 (illetve annak analógja a HYH) játszik fontos szerepet, ugyanakkor nem bizonyított, hogy közvetlenül hatással van a *P5CS1* sóstressz által előidézett transzkripciós serkentésére. A fény szerepét alátámasztandó a tanulmány kiemeli, hogy egymást követő sóstresszek során a sötétadaptált növények válaszreakciója gyengébb és lassabban alakul ki, mint a fényen nevelteknek; a folyamatos fény növeli a memória időtartamát; kulcsfontosságú fényszignalizációs faktorokban (HY5, HYH, phyA, phyB) mutáns növényekben nem alakul ki a memória; valamint kimutatták, hogy a HY5 képes kölcsönhatni a *P5CS1* promóteren található EMF-fel (Essential for Memory Fragment). A HY5 számos fejlődési folyamatban és stresszválaszban játszhat szerepet, Liu és mtsai (2017.) szerint ilyen a foszfátstressz is, amit a tanulmány többféle aspektusból is megközelít. Foszfáthiány esetén jelentős szerepet tulajdonítanak a cukornak, amely képes megnövelni a PSI (Phosphate Starvation Induced) gének expresszióját, illetve serkenti a növény gyökérszerkezetbeli változásának kialakulását (Karthikeyan et al., 2007). Ismert az is, hogy a foszfátéhezés a levelekben a fotoszintézis csökkenését, illetve cukrok és keményítő felhalmozódását eredményezheti (Chiou and Lin, 2011). A tanulmányból kiderül, hogy a távoli vörös, és vörös fény receptorok (phyA, B) és két fényszignalizációs

transzkripciós faktor, az FHY3 és FAR1 - melyek akkumulációját a fény segíti elő - szükségesek a fény által indukált *PHR1* expresszióhoz és PSR-hez, a foszfátéheztetésre adott válasz). Karthikeyan és mtsai (2007.) már leírták, hogy a PSI gének aktivitása csökken, ha fényen nevelt növényeket Pi-mediumon sötétbe helyezünk. Fontos különbség a HY5 szerepében a két tárgyalt folyamatban az, hogy míg a *P5CS1* transzkripciós memóriájának esetében a HY5 elengedhetetlen faktor, a PSR-nél épp az ellenkezőjét mutatták ki: a HY5, ami alapvetően fény jelátviteli utak pozitív szabályozója, represszálja a *PHR1*-et és a PSI gének expresszióját és ellentétesen szabályozza azt, mint a FHY3 és a FAR1. Ebben a tanulmányban leírják az etilént is, mint a PSR fontos szabályozó tényezőjét, ennek a folyamatnak a kulcsgénjei az EIN3 és az EIL1. Ez a két gén serkentőleg hat a PSR-re, a két út vonal (fény és etilén) pedig összekapcsolódik azáltal hogy mind a fény, mind az etilén serkenti az FHY3 fehérje akkumulációját, ezzek szinergisztikus az is, hogy az ACC, mint etilén perkurzor képes blokkolni a fényindukált HY5 protein termelődését. Az eddigi eredmények alapján, miszerint mind a fény, mind az etilén elősegíti az EIN3 akkumulációját (Guo and Ecker, 2003; Shi et al., 2016) ugyanakkor az etilén destabilizálja a HY5-ot (Yu et al., 2013).

Összefoglalásul elmondható, hogy az általunk élesztő egy-hibrid kísérletben izolált feltételezett P5CS1 promóterrel kölcsönható transzkripciós faktorok mind elhelyezhetők a génexpressziós szabályozásról eddig ismertek palettáján. A MYB30 az abszcizinsav jelátviteli utak serkentőjeként kapcsolódhat a prolinszintézis szabályozásának mechanizmusába. Ez a transzkripciós faktor a brasszinoszteroid jelátvitelben is fontos szerepet játszik, erről pedig ismert, hogy gátolja a *P5CS1* kifejeződését. Az IDD5 egy DELLA proteinekkel kölcsönható transzkripciós faktor.Ezek felelnek ozmotikus stressz alatt a növekedés gátlásáért. A BOA egy olyan transzkripciós faktor, ami kölcsönhatásban áll a CCA1 és LHY fehérjékkel, amik a cirkadián óra esszenciális komponensei. A Mustang-3 egy domesztikálódott transzpozon, melynek mutációja esetén a klorofillszintézis és a szénhidrát anyagcsere károsul jelentősen. Az általunk kiemelt foszfátéhezési választ szabályozó transzkripciós faktorokról bebizonyosodott, hogy kötésük a P5CS1 promóterén található P1BS helyhez *in vivo* is megtörténik. A stresszindukált prolinszintézissel és a napjainkban jelentős mezőgazdasági problémákat okozó foszfáthiány által kiváltott növényi válaszokkal kapcsolatban is számos tanulmányt

olvashattunk, eddig azonban a két említett jelenség kapcsolata ismeretlen volt. A részletesebben vizsgált PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorok jó példáját mutatták annak, hogy hogyan függenek össze nem kapcsolt környezeti hatásokra adott válaszok a génexpresszió komplex szabályozása szintjén (27. ábra). Az irodalomban megoszlanak a vélemények a prolin stresszfolyamatok alatti jelentőségével kapcsolatban. Számos stresszfiziológiával kapcsolatos cikkben szerepel, azonban az továbbra is kérdéses, hogy valójában hol és milyen mértékben képes enyhíteni a stressz okozta károsodásokat, illetve, hogy valójában a stresszt közvetlenül jelentő hatásra aktiválódik a szintézise vagy inkább az azt követő ROS-akkumulációnak tulajdonítható.



27. ábra, A prolinmetabolizmus szabályozásak modellje ozmotikus stressz és foszfátéhezés alatt az általunk telált interaktorokkal és kapcsolatokkal kiegészítve. Ozmotikus stressz esetén a prolin akkumulációjához a *P5CS1* indukálódik, míg a *PDH* represszálódik, előbbi szabályozásában fontos szerepet játszik az ABA, mely valószínűleg a P5CS1 promóterén található ABRE elemen keresztül hat. Ebben a reakcióútban elképzelhető, hogy az általunk az Y1H kísérletben azonosított IDD5 és MYB transzkripciós faktorok is szerepet játszanak. A foszfátéhezés indukálja a PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorokat, melyek aktiválják a P5CS1-et annak P1BS motívumához való kötődéssel. Foszfátéhezés esetén a PHR1 és a PHL1 a PDH2-t szintén indukálja. Az NCED3 , mint az ABA szintézis kulcsgénje is indukálódik a foszfátéhezés alatt, a termelődő ABA pedig gátolja a növény növekedését. Ebben a reakcióútban is elképzelhető, hogy az általunk azonosított MYB30 és IDD-5 transzkripciós faktorok is részt vesznek. A foszfátéhezési válaszreakciók és a P5CS1 indukciója egyaránt legalább részben fényfüggő folyamatok.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Szabados Lászlónak és Dr.Horváth V Gábornak szakmai iranyításukért es tanácsaikért, és a munkám során nyújtott segitsegükért. Köszönöm, hogy lehetőséget biztositottak számomra, hogy csoportjukban dolgozva elsajátíthassam a molekuláris növénybiológia alapjait.

Szeretném megköszönni Dr. Györgyey Jánosnak, Zombori Zoltánnak, valamint a Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoport és az Arabidopsis Molekularis Genetikai Csoport minden tagjának segítségét, támogatását.

Köszönettel tartozom Sándor Györgyinek és Török Katalinnak értékes asszisztensi munkájukért.

Végezetül köszönöm feleségemnek Bajczi Adriennek és családomnak, hogy mindvégig kitartóan támogattak.

A munkám anyagi hátterét az alábbi pályázatok finanszírozták: OTKA-NN110962, OTKA-K7623, OTKA-K109719, GINOP 2.3.2-15-2016-00001, és NTP-EFÖ-P-15-0157

IRODALOMJEGYZÉK

Ábrahám E, Hourton-Cabassa C, Erdei L, Szabados L (2010) Methods for determination of proline in plants. Methods Mol Biol 639: 317–331

Ábrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. Plant Mol Biol 51: 363–372

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 311: 91–94

Alves C, Cunha C (2012) Electrophoretic mobility shift assay: Analyzing protein-nucleic acid interactions. In S Magdeldin, ed, Gel Electrophoresis— Advanced Techniques. INTECH, Rijeka, Croatia, pp 205–229

Aung, K.,Lin,S.I.,Wu,C.C.,Huang,Y.T.,Su,C.L.,and Chiou,T.J.(2006). Pho2,a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *PlantPhysiol.* 141, 1000–1011.doi:10.1104/pp.106. 078063

Bari,R.,DattPant,B.,Stitt,M.,andScheible,W.R.(2006).PHO2, microRNA 399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathwayinplants. *PlantPhysiol.* 141, 988–999.doi:10.1104/pp.106.079707

Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ. The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNSI is tightly controlled in response to phosphate limitation. Plant J. 1994;6:673–685.

Baudry, A., and Kay, S. (2008). Clock control over plant gene expression. In Advances in Botanical Research, J.-C. Kader and D. Michel, eds (San Diego: Academic Press), pp. 69–105.

Bayle V,Arrighi JF,Creff A, Nespoulous C, Vialaret J, Rossignol M, Gonzalez E, Paz-Ares J, Nussaume L (2011) Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. Plant Cell 23: 1523 – 1535

Belgaroui N., Zaidi I., Farhat A., Chouayekh H., Bouain N., Chay S. and Curie C. (2014) Over-expression of the bacterial phytase US417 in *Arabidopsis* reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling. Plant Cell Physiol. 55, 1912–1924.

Ben Rejeb K, Lefebvre-De Vos D, Le Disquet I, Leprince AS, Bordenave M, Maldiney R, Jdey A, Abdelly C, Savouré A (2015) Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in Arabidopsis thaliana. New Phytol 208: 1138–1148

Bent AF (2000) Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. Plant Physiol 124: 1540-1547

Bhaskara GB, Yang TH, Verslues PE (2015) Dynamic proline metabolism: Importance and regulation in water limited environments. Front Plant Sci 6: 484

Bournier M, Tissot N, Mari S, Boucherez J, Lacombe E, Briat JF, Gaymard F (2013) Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. J Biol Chem 288: 22670–22680

Briat J-F, Rouached H, Tissot N, Gaymard F and Dubos C (2015) Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in Arabidopsis thaliana: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). Front. Plant Sci. 6:290. doi: 10.3389/fpls.2015.00290

Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis. PLoS Genet 6: e1001102

Casas-Mollano JA, Lao NT, Kavanagh TA (2006) Intron-regulated expression of SUVH3, an Arabidopsis Su(var)3-9 homologue. J Exp Bot 57: 3301–3311

Chen YF, Li LQ, Xu Q, Kong YH, Wang H, Wu WH (2009) The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in Arabidopsis Plant Cell 21: 3554 – 356

Csonka LN (1981) The role of proline in osmoregulation in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. Basic Life Sci 18: 533–542

Chiou,T.J.,Aung,K.,Lin,S.I.,Wu,C.C.,Chiang,S.F.,andSu,C.L.(2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *PlantCell* 18, 412–421.doi:10.1105/tpc.105.038943

Chiou, T.J., and Lin, S.I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 62: 185–206.

Daniel,X.,Lacomme,C.,Morel,J.-B., and Roby,D.(1999).A novel *myb* oncogene homolog in *Arabidopsis thaliana* related to the hypersensitive cell death. *Plant J.* 20, 57–66.

Delauney AJ, Hu CA, Kishor PB, Verma DP (1993) Cloning of ornithine deltaaminotransferase cDNA from Vigna aconitifolia by trans-complementation in Escherichia coli and regulation of proline biosynthesis. J Biol Chem 268: 18673–18678

Delauney AJ, Verma DP (1990) A soybean gene encoding delta 1-pyrroline- 5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in Escherichia coli and is found to be osmoregulated. Mol Gen Genet 221: 299–305

Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J 4: 215–223

Delhaize E , Randall PJ . Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 1995 Jan;107(1):207-213.

Deuschle K, Funck D, Hellmann H, Däschner K, Binder S, Frommer WB (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. Plant J 27: 345–356

Doerner P (2008) Phosphate starvation signaling: A threesome controls systemic P(i) homeostasis. Curr Opin Plant Biol 11: 536–540

Dong B, Rengel Z, Delhaize E (1998) Uptake and translocation of phosphate by *pho2* mutant and wild-type seedlings of *Arabidopsis thaliana*. Planta 205: 251–256

Doolittle WF, Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284: 601–603.

Dubos,C.,Stracke,R.,Grotewold, E.,Weisshaar,B.,Martin,C.,and Lepiniec,L.(2010).MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends PlantSci.* 15, 573–581.

Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. Mol Plant Microbe Interact 17: 343–350

Feng XJ, Li JR, Qi SL., Lin QF, Jin JB , and Hua XJ (2016.) Light affects salt stress-induced transcriptional memory of P5CS1 in Arabidopsis www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1610670114

Fichman Y, Gerdes SY, Kovács H, Szabados L, Zilberstein A, Csonka LN (2015) Evolution of proline biosynthesis: Enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. Biol Rev Camb Philos Soc 90: 1065–1099

Finkelstein R (2013) Abscisic acid synthesis and response. Arabidopsis Book 11: e0166
Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. Plant Cell 10: 1043–1054

Förster-Fromme K, Jendrossek D (2010) AtuR is a repressor of acyclic terpene utilization (Atu) gene cluster expression and specifically binds to two 13 bp inverted repeat sequences of the atuA-atuR intergenic region. FEMS Microbiol Lett 308: 166–174

Fujii,H.,Chiou,T.J.,Lin,S.I.,Aung,K.,andZhu,J.K.(2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis.Curr.Biol.* 15, 2038 2043.doi:10.1016/j.cub.2005.10.016

Funck D, Eckard S, Müller G (2010) Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. BMC Plant Biol 10: 70

Funck D, Stadelhofer B, Koch W (2008) Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. BMC Plant Biol 8: 40

Funck D, Winter G, Baumgarten L, Forlani G (2012) Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. BMC Plant Biol 12: 191

Gallegos JE, Rose AB (2015) The enduring mystery of intron-mediated enhancement. Plant Sci 237: 8–15

Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007) Arabidopsis thaliana deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. Plant Mol Biol 65: 627–644

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, et al. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. Genome Biol. 2006;7:76.

Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/ single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol 350: 87–96

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2013) Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: Living and developing under unfavorable conditions. Plant Cell Rep 32: 1007–1016

Gombos M, Zombori Z, Szécsényi M, Sándor G, Kovács H, Györgyey J (2017) Characterization of the LBD gene family in Brachpodium: A phylogenetic and transcriptional study. Plant Cell Rep 36: 61–79

Guo, H., and Ecker, J.R. (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. Cell 115: 667–677.

Hare, P.D. and Cress, W.A. (1997) Metabolic implications of stressinduced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul. 21, 79±102.

Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M (2007) Chromatin immunoprecipitation: Optimization, quantitative analysis and data normalization. Plant Methods 3: 11

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125: 189–198

Herrera-Estrella L, López-Arredondo D (2016) Phosphorus: The underrated element for feeding the world. Trends Plant Sci 21: 461–463

Hirsch, J.,Marin, E.,Floriani, M.,Chiarenza, S.,Richaud, P.,Nussaume, L., et al. (2006).Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie* 88, 1767–1771.doi:10.1016/j.biochi.2006.05.007

Hoque MA, Banu MN, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. J Plant Physiol 165: 813–824

Hua, X.J., vandeCotte, B., VanMontagu, M., and Verbruggen, N. (1997). Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in Arabidopsis. Plant Physiology 114, 1215-1224.

Hudson ME, Lisch DR, Quail PH (2003) The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. Plant J 34: 453–471

Ibarra JA, Villalba MI, Puente JL (2003) Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the bfp and per operons in enteropathogenic Escherichia coli. J Bacteriol 185: 2835–2847

Ingkasuwan P, Netrphan S, Prasitwattanaseree S, Tanticharoen M, Bhumiratana S, Meechai A, Chaijaruwanich J, Takahashi H and Cheevadhanarak S: Inferring transcriptional gene regulation network of starch metabolism in Arabidopsis thaliana leaves using graphical Gaussian model BMC Systems Biology 2012, 6:100 http://www.biomedcentral.com/1752-0509/6/100

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. Plant J 27: 325–333

Jiang ZF, Huang SZ, Han YL, Zhao JZ, Fu JJ (2012) Physiological response of Cu and Cu mine tailing remediation of Paulownia fortunei (Seem) Hemsl. Ecotoxicology 21: 759–767

Johnson JF, Allan DL, Vance CP, Weiblen G. Root carbon dioxide fixation by phosphorus deficient *Lupinus albus*: contribution to organic acid exudation by proteoid roots. Plant Physiol. 1996;112:19–30.

Joly-Lopez Z, Forczek E, Hoen DR, Juretic N, Bureau TE (2012) A Gene Family Derived from Transposable Elements during Early Angiosperm Evolution Has Reproductive Fitness Benefits in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet 8(9): e1002931. doi:10.1371/journal.pgen.1002931

Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Jain, A., Held, M.A., Carpita, N.C., and Raghothama, K.G. (2007). Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. Planta 225: 907–918.

Karthikeyan AS, Ballachanda DN, Raghothama KG (2009) Promoter deletion analysis elucidates the role of cis elements and 59UTR intron in spatiotemporal regulation of AtPht1;4 expression in Arabidopsis. Physiol Plant 136: 10–18

Kemble AR, MacPherson HT (1954) Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. Biochem J 58: 46–49

Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K (2007) The AtGenExpress global stress expression data set:

protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. Plant J 50: 347–363

Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. Plant Cell 8: 1323–1335

Klecker M, Gasch P, Peisker H, Dörmann P, Schlicke H, Grimm B, Mustroph A (2014) A shoot-specific hypoxic response of Arabidopsis sheds light on the role of the phosphate-responsive transcription factor PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. Plant Physiol 165: 774–790

Laloi C, Havaux M (2015) Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. Front Plant Sci 6: 39

Lee, Y.H., Nadaraia, S., Gu, D., Becker, D.F., and Tanner, J.J. (2003). Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. Nature Structural Biology 10, 109-114.

Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010) Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids 39: 949–962

Lejay,L.,Wirth,J.,Pervent,M.,Cross,J.M.F.,Tillard,P.,andGojon,A.(2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *PlantPhysiol.* 146, 2036–2053.doi:10.1104/pp.107.114710

Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. Plant J 10: 655–661

Lin, S.I., Chiang, S.F., Lin, W.Y., Chen, J.W., Tseng, C.Y., Wu, P.C., and Chiou, T.J. (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. Plant Physiol. 147, 732–746.

Liu,T.Y.,Lin,W.Y.,Huang,T.K.,and Chiou,T.J.(2014).MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *TrendsPlantSci.* 19, 647–655.doi:10.1016/j.tplants.2014.06.004

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25: 402–408

Lohman KN, Gan SS, John MC, Amasino RM (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Physiol Plant 92: 322–328

Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch MA, Parcy F, Simon R, Weigel D (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. Cell 105: 793–803

López-Arredondo DL, Leyva-González MA, González-Morales SI, López- Bucio J, Herrera-Estrella L (2014) Phosphate nutrition: Improving lowphosphate tolerance in crops. Annu Rev Plant Biol 65: 95–123

Lopez-Molina L, Chua NH (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol 41: 541–547

Lynch JP (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. Plant Physiol 156: 1041–1049

Martín AC, del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de La Peña A, Leyva A, Paz-Ares J (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. Plant J 24: 559–567

Mattioli R, Falasca G, Sabatini S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M (2009) The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in Arabidopsis flower transition but not in embryo development. Physiol Plant 137: 72–85

McClung, C.R. (2008). Comes a time. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 514–520.

Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Bläsing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, et al (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. Plant Cell Environ 30: 85–112

Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. Plant J 31: 341 – 353

Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH (2007) Genomewide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. Plant Physiol 143: 156–171

Nilsson L, Lundmark M, Jensen PE, Nielsen TH (2012) The Arabidopsis transcription factor PHR1 is essential for adaptation to high light and retaining functional photosynthesis during phosphate starvation. Physiol Plant 144: 35–47

Nilsson L, Müller R, Nielsen TH (2007) Increased expression of the MYBrelated transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Environ 30: 1499–1512

Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y, Shibata D (1998) Phosphate transporter gene family of Arabidopsis thaliana .DNARes 5: 261 – 269

Ouwerkerk PB, Meijer AH (2001) Yeast one-hybrid screening for DNAprotein interactions. Curr Protoc Mol Biol 55: 12.12.1–12.12.12

Pant,B.D.,Buhtz,A.,Kehr,J.,and Scheible,W.R.(2008). Micro RNA399 is along- distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *PlantJ.* 53, 731–738.doi10.1111/j.1365-313X.2007.03363.x

Pant BD, Burgos A, Pant P, Cuadros-Inostroza A, Willmitzer L, Scheible WR (2015a) The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in Arabidopsis thaliana during phosphorus starvation. J Exp Bot 66: 1907–1918

Pant BD, Pant P, Erban A, Huhman D, Kopka J, Scheible WR (2015b) Identification of primary and secondary metabolites with phosphorusstatus-dependent abundance in Arabidopsis, and of the transcription factor PHR1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation. Plant Cell Environ 38: 172–187

Parre E, Ghars MA, Leprince AS, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savouré A (2007) Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in Arabidopsis. Plant Physiol 144: 503–512

Peterman TK, Goodman HM (1991) The glutamine synthetase gene family of Arabidopsis thaliana: Light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. Mol Gen Genet 230: 145–154

Plaxton WC, Tran HT (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. Plant Physiol 156: 1006–1015

Poirier Y, Bucher M (2002.) Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis The Arabidopsis Book doi:10.1199/tab.0024

puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorilla JM, de Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodríguez J, Leyva A, Rubio V, Sommer H, and Paz-Ares J SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in *Arabidopsis* Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Oct 14; 111(41): 14947–14952. Published online 2014 Sep 30. doi: 10.1073/pnas.1404654111 PMCID: PMC4205628

Raffaele,S.,Vailleau,F.,Leger, A., Joubes,J.,Miersch,O.,Huard, C., et al. (2008). A MYB transcription factor regulates Very-Long-Chain Fatty Acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 752–767.

Redei GP (1975) Arabidopsis as a genetic tool. Annu Rev Genet 9: 111-127

Reimer JJ, Turck F (2010) Genome-wide mapping of protein-DNA interaction by chromatin immunoprecipitation and DNA microarray hybridization (ChIP-chip). Part A: ChIP-chip molecular methods. Methods Mol Biol 631: 139–160

Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot 57: 1017-23 Epub

Rouached H, Arpat AB, Poirier Y (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. Mol Plant 3: 288–299

Rowe JH, Topping JF, Liu J, Lindsey K (2016) Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. New Phytol 211: 225–239

Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. Genes Dev 15: 2122–2133

Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 45: 309–317

Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in Arabidopsis thaliana. Mol Gen Genet 254: 104–109

Saradhi P.P., Alia, Arora S. & Prasad K.V. (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. Biochemical and Biophysical Research Communications 209, 1–5

Schat H, Sharma SS, Vooijs R (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris. Physiol Plant 101: 477–482

Senthil-Kumar M, Mysore KS (2012) Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. Plant Cell Environ 35: 1329–1343

Servet C, Ghelis T, Richard L, Zilberstein A, Savoure A (2012) Proline dehydrogenase: A key enzyme in controlling cellular homeostasis. Front Biosci (Landmark Ed) 17: 607–620

Sharma S, Verslues PE (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline

metabolism during low water potential and stress recovery. Plant Cell Environ 33: 1838–1851

Sharma S, Villamor JG, Verslues PE (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. Plant Physiol 157: 292–304

Shi, H., Shen, X., Liu, R., Xue, C., Wei, N., Deng, X.W., and Zhong, S. (2016). The red light receptor phytochrome B directly enhances substrate-E3 ligase interactions to attenuate ethylene responses. Dev. Cell 39: 597–610.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. Plant, cell & environment 30: 1126–1149.

Song L, Huang SC, Wise A, Castanon R, Nery JR, Chen H, Watanabe M, Thomas J, Bar-Joseph Z, Ecker JR (2016) A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. Science 354: aag1550

Steffens NO, Galuschka C, Schindler M, Bülow L, Hehl R (2005) AthaMap web tools for database-assisted identification of combinatorial cis-regulatoryelements and the display of highly conserved transcription factor binding sites in Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res 33: W397–W402

Stracke,R.,Werber,M.,and Weisshaar, B.(2001).TheR2R3-*MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin.PlantBiol.* 4, 447–456.

Strizhov N, Abrahám E, Okrész L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. Plant J 12: 557–569

Szabados L, Savouré A (2010) Proline: A multifunctional amino acid. Trends Plant Sci 15: 89–97

Székely G, Abrahám E, Cséplo A, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, et al (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. Plant J 53: 11–28

Thiery L, Leprince AS, Lefebvre D, Ghars MA, Debarbieux E, Savouré A (2004) Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 279: 14812–14818

Ticconi CA, Delatorre CA, Abel S (2001) Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in Arabidopsis. Plant Physiol 127: 963–972

Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S Torriani-Gorini A (1994) The Pho regulon of Escherichia coli. in Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology. eds Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S (American Society for Microbiology, Washington, DC), pp 1–4.

Valentinuzzi F, Pii Y, Vigani G, Lehmann M, Cesco S, Mimmo T (2015) Phosphorus and iron deficiencies induce a metabolic reprogramming and affect the exudation traits of the woody plant Fragaria3ananassa. J Exp Bot 66: 6483–6495

Vailleau,F.,Daniel,X.,Tronchet, M., Montillet,J.L.,Triantaphylides, C., and Roby, D.(2002).AR2R3-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc .Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10179–10184.

Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci 151: 59–66

Verslues PE, Sharma S (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. Arabidopsis Book 8: e0140

Ward,J.T.,Lahner,B.,Yakubova,E.,Salt,D.E.,and Raghothama,K.G. (2008).The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147, 1181–1191.doi:10.1104/pp.108. 118562

Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. EMBO J 25: 3133–3143

Woo J, MacPherson CR, Liu J, Wang H, Kiba T, Hannah MA, Wang XJ, Bajic VB, Chua NH (2012) The response and recovery of the Arabidopsis thaliana transcriptome to phosphate starvation. BMC Plant Biol 12: 62

Yancey PH Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J Exp Biology 2005 Aug;208(Pt 15):2819-30.

Yang SL, Lan SS, Gong M (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. J Plant Physiol 166: 1694–1699

Yong-Villalobos L, Cervantes-Pérez SA, Gutiérrez-Alanis D, Gonzáles- Morales S, Martínez O, Herrera-Estrella L (2016) Phosphate starvation induces DNA methylation in the vicinity of cis-acting elements known to regulate the expression of phosphate-responsive genes. Plant Signal Behav 11: e1173300

Yoshiba Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi- Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress. Plant J 7: 751–760

Yu, Y., Wang, J., Zhang, Z., Quan, R., Zhang, H., Deng, X.W., Ma, L., and Huang, R. (2013). Ethylene promotes hypocotyl growth and HY5 degradation by enhancing the movement of COP1 to the nucleus in the light. PLoS Genet. 9: e1004025.

Zhang CS, Lu Q, Verma DP (1995) Removal of feedback inhibition of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. J Biol Chem 270: 20491–20496

Zhou J, Goldsbrough PB (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. Plant Cell 6: 875–884

Zouari M, Ben Ahmed C, Elloumi N, Bellassoued K, Delmail D, Labrousse P, Ben Abdallah F, Ben Rouina B (2016) Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of Olea europaea L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. Ecotoxicol Environ Saf 128: 195–205

ÖSSZEFOGLALÁS

A növények, helyhez kötött életmódjuknak köszönhetően ki vannak szolgáltatva a környezeti változásoknak, melyek akár hátrányosan is befolyásolhatják növekedésüket, fejlődésüket, és szaporodásukat. Ezekre a stresszfolyamatokra válaszul a növények számtalan jelátviteli-,és anyagcsereutat fejlesztettek ki, ezeket komplex szabályozó utak irányítják és segítségükkel mérsékelni tudják károsodásukat. A stresszindukált metabolitok közül az egyik legfontosabb a szabad prolin. Számos tanulmányban kimutatták, hogy felhalmozódik só-, szárazságstressz, nehézfémek, és egyes patogének indukálják felhalmozódását. A növényi védekezésben betöltött szerepe sokrétű lehet: hathat ozmoprotektánsként, szerepet játszhat enzimek és sejtstuktúrák stabilizálásában, reaktív oxigén formák kioltásában és a redox egyensúly fenntartásában. Ezeken felül a prolin fontos szerepet játszik a növény fejlődésének szabályozásában, a virágzásban, az embrió és a levél kialakulásában is. A prolin mennyiségét a bioszintézis és a lebontás közötti egyensúly határozza meg. A bioszintézis a glutaminsav útvonalon keresztül zajlik, és kulcsenzime a pirrolin-5-karboxilát szintáz (P5CS). Ennek Arabidopsisban két izoformája ismert, a háztartási génként működő P5CS2 és a stresszindukált P5CS1. Doktori munkám során célul tűztem ki, hogy olyan, eddig még le nem írt P5CS1 promóterrel kölcsönható transzkripciós faktorokat keressek, amelyek közelebb visznek minket a stresszindukált prolinszintézis és annak egyéb vonatkozásainak pontosabb megértéséhez. Élesztő egy-hibrid kísérletben kölcsönható parterként többek között a foszfátéhezés kulcsregulátora(i)ként ismert *PHR1* (Phosphate Starvation Response-1) és *PHL1* (Phosphate Starvation Response-1 Like) transzkripciós faktorokat is eredményül kaptam. A foszfátéhezéskor betöltött szerepük mellett ezekről a transzkripciós faktorokról ismert, hogy szerepet játszanak a kén, a vas és a cink transzportjának szabályozásában is. A PHL1 indukcióját kimutatták só-, és ozmotikus stressz következtében is, valamint a PHR1 és a PHL1 szabályozódhat a stressz hormon ABA jelátviteli úton keresztül, és a P5CS1-hez hasonlóan a fény meghatározó szerepet játszik aktiválódásukban. Dolgozatomban Electromobility Shift Assay (EMSA) és Kromatin Immunoprecipitáció ChIP kísérletekkel bizonyítottam az élesztő egy hibdrid rendszer eredményeit, megállapítottam, hogy az *E. coli*-ban termeltetett PHR1 és PHL1 fehérjék szelektíven

képesek kötődni a P1BS helyet tartalmazó P5CS1 promóter fragmenthez és ez a kötés a PHR1 esetén kisebb fehérjekoncentráció mellett képes létrejönni. A ChIP kísérletben pedig a HA-epitóp taggelt *phr1-HA* növényekben kimutattam, hogy a P1BS-t tartalmazó promóter fragment az immunoprecipitációt követő polimeráz láncreakció során feldúsul a kötőhelyet nem tartalmazó fragmentekhez képest. Ezt követően tanulmányoztuk a foszfátéhezés tüneteit vad típusú és mutáns Arabidopsis vonalakban is, mind élettani, mind molekuláris biológia szempontokból. Elsőként az Arabidopsis Columbia 0 (Col0) ökotípus viselkedését tanulmányoztam foszfátéhezés alatt. Itt találkoztunk az irodalomból már jól ismert foszfátéhezés élettani reakcióval, mint a főgyökér növekedés gátlása, a megnövekedett oldalgyökér-képződés, a hajtás növekedésgátlása és antocián felhalmozódás. A gyökérben *p5cs1-gfp* konstrukció segítségével nyomon követtük az enzim mennyiségi és térbeli változását is, és azt tapasztaltuk, hogy míg kontroll körülmények között egyedül a főgyökér csúcsából sikerült detektálni GFP jelet, addig az éheztetett növényben a főgyökér csúcsában a jel elhalványul, és az oldalgyökerek eredésénél, valamint azok gyökércsúcsában válik kifejezetté. Megfigyeltük, hogy foszfátéheztetés során a vad típusú Arabidopsis a kontrollhoz képest négyszeres mennyiségben termel prolint és emögött a P5CS1 indukciója áll. Génexpressziós szinten eltérést mutatott még a prolin degradációjáért felelős ProDH2 enzim is, amely a P5CS1-hez hasonlóan indukálódott.A indukció mértéke hajtásban enyhébb, gyökérben erősebb volt, mint azt a P5CS1-nél tapasztalhattuk. A foszfátéhezés jellemző molekuláris markere az IPS1 gén, expressziója a mi esetünkben a 14 nap után a kontrollhoz képest többezerszeresére nőtt. A foszfátéhezéssel járó károsodásokra utal a növényekben mért megemelkedett lipid-peroxidáció valamint H_2O_2 szint is. Megvizsgáltuk a *phr1*, *phl1* és *phr1phl1* mutánsokban is a foszfátéhezés tüneteit. Kontrol körülmények között a vad tipusú Columbiához hasonlóan növekedtek, de foszfátéhezés hatására a szimpla mutáns *phr1* és különösen a dupla *phr1phl1* mutáns szignifikánsan visszamaradtak a növekedésben, és mindhárom mutánsban megfigyelhető volt a levelek fakulása is, amivel a vad típusban egyáltalán nem találkoztunk. A prolin termelődést is megvizsgáltuk ezekben a mutáns növényekben foszfátéheztetés alatt, és ennek szintje 50%-kal elmaradt a vad típushoz képest. Ezzel egybevágnak génexpressziós megfigyeléseink is, melyekben ezek a mutánsok alig mutattak P5CS1 indukciót, azonban a ProDH2

indukciója hajtásban magasabb, míg gyökérben jóval alacsonyabb volt, mint a vad típusban. Mivel mind a stresszindukált prolinszintézis, mind a foszfátéhezés működhet abszcizinsav-függő útvonalon, ebben az irányban is végeztünk kísérleteket. Az ABA-szintézisében gátolt *aba2-3* mutánsban foszfátéheztetés alatt csak minimális növekedésgátlást tapasztaltunk a kontrollhoz képest, ugyanakkor erre a vonalra volt a leginkább jellemző a levelek fakulása. A szabad prolin szintje csak minimálisan emelkedett meg a konrtollhoz képest, és a *P5CS1* indukciója is jelentősen alulmaradt a *Columbia*-nál mérhető értéknek. ABA jelátviteli útban károsodott mutánsokat is vizsgáltunk, ezek közül az *abi4-1* az *aba2-3*-hoz hasonlóan viselkedett, míg az *abi5-1* a Columbiánal tapasztalt értékekhez hasonlót mutatott. Azt, hogy a foszfátéhezésre bekövetkező szabad prolin szintézisban legalább részben az ABA-jelátviteli út is szerepetjátszik az is igazolja, hogy éhezéskor az abszcizinsan bioszintézis kulcsgénjének az NCED3-nak a háromszoros indukcióját tapasztaltuk a kontrollhoz képest. Valós idejű PCR-rel igazoltuk továbbá, azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint a PHR és PHL1 transzkripciós faktorok expressziója nem változik a foszfátéhezés során, illetve azt is, hogy a növények foszfátéhezésre mutatott fenotípusa elképzelhető, hogy valamilyen szinten kapcsolatban állhat a szeneszcencia folyamatával. A prolin szerepét a foszfátéhezés alatt *p5cs1-1*, *pdh1-4* és *pdh2-2* mutánsokkal teszteltük foszfát jelenlétében, illetve hiányában. Ezek rozettanövekedése hasonló volt a vad típuséhoz normál és Pi- táptalajon is. Ezen vonalak gyökérnövekedése Pi+ táptalajon hasonló volt a vad típushoz, foszfáthiányos táptalajon pedig a a pdh1-4 és pdh2-2 a Columbiához hasonló gyökérhosszt mutatott, míg a p5cs1-1 gyökerei kissé, bár szignifikánsan rövidebbnek bizonyultak. Kísérleti rendszerünkben a hozzáadott prolin nem segített a növényekben a foszfátéhezés okozta károsodások enyhítésében.

Disszertációmban bemutattam, hogy az élesztő egy-hibrid rendszerben talált interaktorok mind beleilleszthetők a prolinszintézis szabályozásának rendkívül összetett hálózatába. A MYB30 és az IDD5 transzkripciós faktorok az ABA jelátviteli úttal állnak kapcsolatban, míg a BOA működése a P5CS1-hez hasonlóan a cirkadián óra által szabályozott, míg a Mustang egy olyan domesztikálódott transzpozon, amely a klorofillszintézisben és a szénhidrátanyagcsere szabályozásában játszik szerepet. Kimutattam, hogy a foszfátéhezés, amely napjaink mezőgazdaságában egy aktuális

probléma egyike azoknak a stresszformáknak, amelyben felhalmozódik a prolin, így igyekezvén elkerülni a károsodást, és ez az indukció legalább részben abszcizinsav függő útvonalon zajlik. Irodalmi adatokból valószínűsíthető, hogy mivel mind a P5CS1 mind a PHR1(PHL1) aktiválásában esszenciális szerepet tölt be a fény, talán ez az a pont, ahol a két útvonal a növényben találkozik, így a további munkák ebben az irányban ígéretesnek eredményekkel kecsegtetnek.

SUMMARY

Plants as sessile organisms are constantly exposed to various environmental factors, which may have deleterious effects on their growth, development and reproduction. Plant have developed multiple protective mechanisms including highly regulated metabolic and signalling patways to cope with these stresses and diminish the damages. Proline (Pro) is one of the most common among stress induced metabolites. Proline is known to accumulate to high levels in numerous plant species at low water potential caused by drought and salinity. Several reports also describe proline accumulation in response to other types of stress eg. heavy metals oxidative agents, or certain pathogens. Different protective functions were attributed to Pro, suggesting that it acts as osmoprotectant, stabilizing cellular structures and enzymes and scavenging reactive oxygen species, and maintains redox equilibrium in adverse conditions. Besides functioning as a stress metabolit, proline plays role in the regulation of plant development, including flowering, pollen, embryo, and leaf development. The level of proline content is determined by the balance between its biosynthesis and degradation.

The Glu-derived pathway is the most important for Pro biosynthesis in plants and the whole process is controlled by the first and rate-limiting step, mediated by the feedback regulated P5CS enzyme, which in model plant Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) is encoded by two genes, *P5CS1* and *P5CS2*. The *P5CS2* acts as a housekeeping gene, and the *P5CS1* is responsible for stress induced proline biosynthesis. The aim of my PhD works was to find a transcription factor as yet non-described interactor of *P5CS1*, to gain new aspects to stress induced proline production. In Yeast 1-Hybrid experiments emerged PHR1 and PHL1 the two main regulators of the phosphate starvation response as putative interactors of *P5CS1* promoter. Besides the phosphate starvation response the PHR1 plays role in the regulation of sulfur, zinc and ferrous transport and the induction of PHL1 has been shown as a result of salt and osmotic stress. Both transcription factors can be regulated by ABA-dependent pathways, and light proved to be essential for their activity. In my thesis I validated the results of the Y1H assay with EMSA and Chromatine Immunoprecipitation. I showed, that purified PHR1 and PHL1 proteins can selectively bind to *P5CS1* promoter fragment, if it contains the P1BS site

(GAATATTC) and PHR1 showed higher affinity to the binding site than PHL1. In the ChIP experiment with *phr1-HA* construct I showed the enrichment of the P1BS containing *P5CS1* promoter fragment in real time PCR subsequent to immunoprecipitation. I studied the symptoms of phosphate starvation on wild type and mutant Arabidopsis thaliana lines both at physiological and molecular levels. In case of *Columbia* after 14 days of phosphate starvation the growth inhibition of the main root and the increased lateral root formation was clearly visible. The inhibition of the shoot growth and the increased anthocyanine accumulation was also typical response to phosphate starvation. To study spatial changes in P5CS1 protein levels during phosphate starvation, fluorescence of the GFP-tagged P5CS1 was monitored in transgenic Arabidopsis plants harboring the genomic P5CS1-GFP gene fusion. GFP derived fluorescence in roots of transgenic plants was weak and was detectable only close to the root tips of plants cultured on standard medium. GFP-derived fluorescence was, however, well visible in P5CS1-GFP plants on plates lacking phosphate. Enhanced fluorescence was detectable in root elongation zone as early as 4 days after transfer to phosphate-deprived medium, when other phenotypic alterations were not yet visible. Root proliferation is a characteristic developmental response of phosphate-starved plants, which facilitates phosphate uptake from Pi deficient soils. GFP-derived fluorescence was strong in proliferating lateral roots also, which was typical in plants after 7 days or longer phosphate starvation. Phosphate deprivation in our experimental system caused accumulation of hydrogen peroxide, enhanced lipid peroxidation, and more than one-thousand-fold induction of induced by phosphate starvation1 (IPS1) gene, known to be responsive to phosphate starvation. In the free proline level a 4 fold increase can be found in phosphate starving plants compared to the controls. Expression of genes that are known to control proline metabolism was considerably altered by phosphate starvation. *P5CS1* expression increased 3- to 5-fold, while *PDH2* expression was enhanced by 4- to 6-fold in shoots and roots under phosphate starvation.

To test the role of PHR1 and PHL1 factors in regulation of proline metabolism, and in the effects of phosphate deprivation, *phr1*, *phl1*, and *phr1phl1* double mutants were compared to wild-type plants under phosphate starvation. Rosette growth of *phr1*, *phl1*, and *phr1phl1* mutants was similar to wild-type plants in standard, phosphate-containing

medium, while in the absence of phosphate, *phr1* and *phr1phl1* mutants were significantly smaller than wild-type. Proline levels in these mutants were similar to wild-type plants in standard culture conditions but were 50% lower than in *Col-0* plants during phosphate starvation In our experimental system, phosphate deprivation reduced growth of wild-type Arabidopsis plants by nearly 50%. Gene expression experiments showed that these phosphate starvation factor mutants hardly showed induction of *P5CS1*, adversely the *PDH2* proved to be more induced in the shoots, less in the roots compared to the wild type. The stress induced proline production is known to be at least partly ABA dependent, we carried out experiments to clarify the importance of this hormone in case of phosphate starvation. Proline content and transcript levels of proline metabolic genes were tested in the *aba2-3* mutant, in which ABA biosynthesis is blocked and in *abi4-1* and *abi5-1* mutants, in which key ABA signaling pathways are impaired. While phosphate deprivation enhanced free proline content three to four times in wild-type plants and in the *abi5-1* mutant, it was only slightly increased in the phosphate-starved *aba2-3* in *abi4-1* mutants When compared to wild-type plants, Pi starvation dependent activation of P5CS1 was reduced by 50% in aba2-3 and in abi4-1 mutants, while it was less affected in shoots and more reduced in roots of abi5-1. It was striking, that the *aba2-3* line showed just a minimal inhibition of shoot growth but the bleaching of the leaves was more visible. Expression of PDH2 was not affected in shoots of these mutants, while in roots of *abi4-1* and *abi5-1* it was higher and lower than wild type, respectively. ABA biosynthesis is controlled by the drought-induced NCED3 and its induced expression during phosphate starvation also strengthen that the ABA at least partly plays role in phosphate starvation signalling. With real time PCR we validated that *PHR1* and *PHL1* do not show induction upon phosphate starvation and the effects of phosphate starvation can therefore be associated with senescence-related processes.. The role of the proline in case of phosphate deprivation was tested with *p5cs1-1*, *pdh1-4* és *pdh2-2* both phosphate containing and lacking media. These plants showed similar shoot and root growth as the wild type in presence of phosphate, but on phosphate lacking media de *p5cs1-1* line showed slightly but significantly inhibited root growth. In our experimental system, the exogenously applied proline did alleviated the phophate starvation caused damages.

In my PhD thesis I showed that the interactors from the Y1H experiments can all be fit into the complex network of stress induced proline synthesis. The MYB30 and IDD5 by a direct on indirect way are connected with the ABA signalling, the work of BOA –as in the case of P5CS1-is connected with the circadian clock, and the Mustang plays role in chlorophyll synthesis and carbohydrate metabolism. I showed that phosphate starvation as one of the major problem of these days agriculture is also a type of stress that provokes proline accumulation and this process at least partly is proceeds in ABA-dependent pathway. Recent studeid showed that light –and the HY5 transcription factor-plays cricial role in the activation of both P5CS1 and PHR1 and suggests the this can be a kind of connection between these two processes.