

**Egy új genetikai módszerrel azonosított
Arabidopsis A4A hősokk faktor funkcionális
jellemzése**

Tézisfüzet

Immaculada Pérez Salamó

Témavezető: Dr. Szabados László

MTA Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológia Intézet

SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szeged

2014

BEVEZETÉS

A helyhez kötött életmódjuk miatt, a növények növekedése, fejlődése és túlélése is a környezetüktől függ. A környezeti viszonyok gyakran kedvezőtlené válnak és ez stresszt okoz a növények számára. A megváltozott körülményekkel szemben a növények számos védekező stratégiát fejlesztettek, amelyek biokémiai és fiziológiai változásokat idéznek elő. Azokat a folyamatokat, amelyek a stresszhez való alkalmazkodást és toleranciát biztosítják egy komplex jelátviteli hálózat szabályozza ami végsősoron génkifejeződések megváltozásához vezet. Jelenleg keveset tudunk arról, hogy a növények hogyan érzékelik a stresszt, valószínűleg stressz-specifikus receptorok aktiválják a jelátviteli hálózatokat. A szignálokat másodlagos hírvivő molekulák közvetítik, ilyen molekulák a foszfolipidek, a ciklikus nukleotidok, a hormonok, a Ca^{2+} és a reaktív oxigén fajták (ROS). Ezek sokszor poszt-transzlációs módosításokért felelős enzimeket aktiválnak, mint pl. a fehérje foszforilációt végző CIPK, CDPK and MAP kinázokat. A fehérje foszforilációk számos stressz-válasz molekula aktivitását tudják szabályozni, többek között transzkripciós faktorokét is. Általánosságban elmondható, hogy a stressz tolerancia mechanizmusok a homeosztázis fennartására, a ROS detoxifikálásra és a sejtkomponensek közvetlen védelmére irányulnak

Ma már nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre az abiotikus stressz toleranciáról, ami főleg a növényi modell, az *Arabidopsis thaliana* kutatásokból származik. Az Arabidopsis genom megszekvenálása és hatékony genetikai módszerek kifejlesztése fontos szerepet játszik abban, hogy a stressz válaszok molekuláris mechanizmusait vizsgáljuk. A genetikai szűrések nagyon hasznosnak bizonyultak a stressz válasz gének azonosításában

CÉLKITŰZÉSEK

A munkám általános célja olyan, eddig nem ismert szabályozó gének azonosítása és jellemzése az *Arabidopsis thaliana* modell növényben, amelyek a növények stresszválaszának szabályozásában vesznek részt.

- Az indukálható cDNS könyvtár transzformáció felhasználásával egy sejt szintű szelekciós rendszer kidolgozása ami alkalmas a stresszválaszt szabályozó *Arabidopsis* gének azonosítására.
- Több olyan transzformált vonal izolálása, amelyek ösztradiol indukciótól függő, stressz tolerancia fenotípust mutatnak megfelelő szelekciós körülmények között.
- Egy vagy több *Arabidopsis* gén izolálása a kisselektált sejt vonalakból, amelyek felelősek a tolerancia fenotípus kialakulásáért.
- Legalább egy gén funkciójának jellemzése, az alábbi szempontok szerint:
 - Az adott gén túltermelését megvalósító transzgenikus *Arabidopsis* vonalak fenotípusának, stressz toleranciájának élettani jellemzése.
 - Az adott gént inaktiváló T-DNS inszerciós mutánsok azonosítása, a mutánsok stresszválaszának jellemzése.
 - A kódolt fehérje biokémiai, molekuláris funkciójának jellemzése.
 - Az azonosított és jellemzett gének segítségével a stresszválaszt szabályozó jelátviteli utak jobb megismerése.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- ❖ *Arabidopsis* sejt kultúrák transzformálása és szűrése.
- ❖ Transzgenikus *Arabidopsis* növények létrehozása *Agrobacterium* általi transzformálással.
- ❖ T-DNS inszerciót tartalmazó mutáns jellemzése.
- ❖ Az abiotikus stressz tolerancia *in vitro* vizsgálata (só, ozmotikus és oxidatív stressz).
- ❖ Tranziens fehérje expresszió *Arabidopsis* protoplastokban.

- ❖ Molekuláris biológiai módszerek:
 - DNS klónozás, szekvencia analízis, helyspecifikus mutagenézis.
 - RNS izolálás, cDNS szintézis. Génexpressziós vizsgálatok kvantitatív és semi-kvantitatív PCR-el.
 - Rekombináns fehérje kivonás és tisztítás, western analízis, immun precipitáció tag-gel jelölt fehérjékkel.
 - *In vitro* fehérje foszforiláció, in-gél kináz próba.
 - Riporter konstrukciók (GFP, YFP) *in vivo* megfigyelése, vizualizálása konfokális mikroszkóppal, luciferáz enzim aktivitás mérés, hisztokémiai festés (GUS).
 - *In vivo* fehérje-fehérje kölcsönhatási technikák (élesztő kettős hibrid, Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementáció, BiFC).

EREDMÉNYEK

1. Egy random Arabidopsis cDNS könyvtárat használtam, aminek a kifejeződését ösztradiol indukálható promóter szabályozta (Papdi, 2008). A cDNS könyvtárat Arabidopsis sejtszuszpenzióban túltermelve hozzávetőlegesen 1,2 millió transzformált sejt kolónia osztódási képességét vizsgáltam só stressz jelenlétében. Négy olyan sejtszuszpenzióból származó mikrokolóniát találtam, ami ösztradioltól függően, só toleráns módon növekedett.
2. Meghatároztam a só toleranciát mutató sejt kolóniákba beépült cDNS fragmenteket. Az egyik kolónia sejtjeibe beépült T-DNS egy hő sokk transzkripciós faktor a *HSFA4A* teljes hosszúságú cDNS-ét tartalmazta, ennek a génnek a funkcionális jellemzését végeztem el.
3. Igazoltam, hogy a HSFA4A faktor felelős a só tolerancia kialakulásáért. Ösztradiol-függő só toleráns mikrokolóniákat kaptam, amikor az ER8-HSFA4A plazmidot újra Arabidopsis sejtszuszpenzióba transzformáltam. A HSFA4A Arabidopsis növényekben való túltermelése só, paraquat, H₂O₂, anoxia, CdCl₂ és mannitol toleranciát okozott, mindezek a körülmények összefüggésbe hozhatóak az oxidatív stresszel is.
4. Jellemeztem a HSFA4A túltermelő vonalak élettani jellemzőit. Só stressznek kitéve a HSFA4A túltermelése a lipid peroxidáció és a H₂O₂ tartalom csökkenését idézte elő Arabidopsisban. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az HSFA4A túltermelése csökkentette a só indukált oxidatív károsodás mértékét. Mindezekből arra következtettünk, hogy az HSFA4A hozzájárul az Arabidopsis oxidatív stressz toleranciájához.

5. Jellemeztem a HSFA4A transzkripció szabályozását. Az *HSFA4A* génkifejeződés vizsgálata, a hozzáférhető microarray adatokkal összhangban arra engedett következtetni, hogy az *HSFA4A* számos stressz körülmény hatására indukálódik. Hidrogén-peroxid kezelés a *HSFA4A* kifejeződés gyors indukcióját okozta, és ezt követően a HSFA4A mRNS magas szintje több napon keresztül kimutatható volt.

6. RNS szekvenálással azonosítottuk az HSFA4A által szabályozott Arabidopsis géneket. Az HSF4A4 többek között ismert stressz-válasz géneket szabályoz: pl. *ZAT6*, *ZAT12*, *HSP17.6A*, *ATL31*, *CRK13*, *WRKY30* és *CTP1*. Kvantitatív RT-PCR módszerrel jellemeztem néhány, a HSFA4A által szabályozott gén működését.

7. Az HSFA4A inaktiválása a *hsfa4a* inszerciós mutánsban só-érzékeny növekedést, megnövekedett lipid peroxidációt és H₂O₂ felhalmozódást idézett elő. A *hsfa4a* mutáns genetikai komplementációja helyre tudta állítani a vad típusra jellemző só-tartalmú táptalajon való növekedési tulajdonságokat. A só stresszel kezelt *hsfa4a* növényekben a *ZAT6*, *ZAT12*, *WRKY30* és *CTP1* gének alacsonyabb szinten fejeződtek ki mint a vad típusú növényekben.

8. Egy korábban felvázolt modell szerint a ROS felhalmozódás hatására a hő sok faktorok multimerekké állnak össze, ami elengedhetetlen a célgének transzkripció indukciójához. Élesztő két-hibrid és kétmolekuláris fluoreszcencia komplementáció (BIFC) kísérlettel igazoltam, hogy a HSFA4A homodiméreket képes létrehozni, és ezek a homodimérek só stress hatására a sejtmagban halmozódnak fel. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat cisztein oldalláncok közötti diszulfid-hidak stabilizálhatják. Három konzervált cisztein aminosav alaninra történő kicserélése a dimerizációs kölcsönhatások csökkenését idézte elő élesztő és Arabidopsis sejtekben is.

9. Élesztő kéthibrid és BIFC kísérletekkel azt is sikerült kimutatni, hogy az HSFA4A kölcsönhat két mitogen-aktivált kinázzal az MPK3-al és az MPK6-al. Két különböző módszerrel, *in-gel* és *in vitro* kináz reakciókat alkalmazva bizonyítottam, hogy mindkét MAP kináz képes a HSFA4A-t foszforilálni. A HSFA4A foszforilációs helyeit tömeg spektrométerrel tudtuk meghatározni. Hely-specifikus mutagenézist követő *in vitro* kináz assay-vel kimutattam, hogy a 309 pozícióban levő szerin (Ser309) a legfontosabb foszforilációs hely.

10. Egy riporter gén konstrukció segítségével igazoltam a HSFA4A foszforiláció biológiai fontosságát. A túltermelt HSFA4A Ser309Ala aminosav cserélt változata a vadtypussal összehasonlítva kisebb mértékben tudta a HSP17.6A promóterét aktiválni mint a vadtypusú HSFA4A.

Eredményeink igazolták, hogy a HSFA4A fontos szerepet játszik a reaktív oxigének és a MPK3 és MPK6 MAP kinázok által közvetített jelátviteli folyamatok szabályozásában.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A PhD értekezés a következő cikken alapul:

Perez-Salamo I, Papdi Cs, Rigo G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horvath B, Domoki M, Darula Z, Medzihradzky K, Bogre L, Koncz Cs, Szabados L (2014) The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6. *Plant*

Más publikációk, melyek kapcsolódnak az értekezéshez:

Papdi Cs, Joseph MP, **Pérez-Salamó I**, Vidal S, Szabados, L (2009) Genetic technologies for the identification of plant genes controlling environmental stress responses. *Funct Plant Biol* 36:696-720., MTMT: 1920786, IF: 2.471

Papdi Cs, Leung, J, Joseph MP, **Pérez-Salamó I**, Szabados L (2010) Genetic screens to identify plant stress genes. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 639. New York: Humana Press. 639: 121-139, MTMT: 1921541

Egyéb publikációk:

Ruibal C, **Pérez-Salamó I**, Carballo V, Castro A, Bentancor M, Borsani O, Szabados L, Vidal S (2012) Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Sci* 190:89-102. MTMT: 2014259, IF: 2.922

Ábrahám E, **Pérez-Salamó I**, Koncz C, Szabados L (2011) Identification of *Arabidopsis* and *Thellungiella* genes involved in salt tolerance by novel genetic system. *Acta Botanica Szegediensis* 55:53-57, MTMT: 1922012

FELELŐS SZERZŐI NYILATKOZAT

Mint az alábbi publikáció felelős szerzője kijelentem, hogy Imma Pérez-Salamó meghatározó szerepet játszott az alábbi tudományos közlemény létrejöttében, mivel ő végezte el a tudományos kísérleteket. Hozzájárulok, hogy a közleményben publikált eredményeket Imma Pérez-Salamó felhasználja a Ph.D. dolgozatában. Kijelentem hogy ezek az eredmények más Ph.D. dolgozatban nem szerepeltek, és a jövőben sem fognak szerepelni.

Perez-Salamo I, Papdi C, Rigo G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horvath B, Domoki M, Darula Z, Medzihradszky K, Bogre L, Koncz C, Szabados L (2014) The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol* 165: 319-334

Szeged, 2014.05.26.



.....
Dr. Szabados László