

Ph.D. értekezés tézisei

**A prolin felhalmozódás, és az ebben kulcsszerepet játszó gének transzkripcionális szintű vizsgálata *Arabidopsis thaliana*-ban**

**Készítette: Temesváriné Ábrahám Edit**

Témavezetők: Dr. Szabados László és Dr. Koncz Csaba

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

Szegedi Tudományegyetem  
Molekuláris és Sejtbiológia Doktori Program  
Szeged

2004

## Bevezetés, előzmények

A mezőgazdasági termelést akadályozó környezeti tényezők közül világviszonylatban a termőterületek sótartalmának növekedése, a szárazság és az alacsony hőmérséklet a legfontosabbak. Mindhárom tényező az ozmotikus nyomás magváltozása által károsítja a növényeket (ozmotikus stressz). A növények adaptív mechanizmusokat fejlesztettek ki a túlélés érdekében. Ezek közé morfológiai és fejlődésbeli változások (pl. az élekciklus rövidülése kedvezőtlen környezeti feltételek között, a hajtás növekedésének gátlása és a gyökérzet növekedésének elősegítése), az ionok transzportjában (pl. az ionok felvételében és kiválasztásában), valamint a metabolizmusban (pl. kompatibilis ozmolitok szintézise) bekövetkező változások tartoznak. A növények morfológiai adaptációja nagyon fontos lehet az adott faj számára, azonban nem általánosan elterjedt a növényvilágban. Az alapvető sejtszintű ozmotikus válaszreakciók azonban (mint pl. az ozmolitok szintézise) konzerváltak a növényfajok között.

A növényekben az evolúció során kialakult számos élettani és biokémiai védekező mechanizmus működése megnyilvánul a génexpressziós mintázat jelentős átalakulásában. A vízvesztés során indukálódó gének termékei többféle funkciót láthatnak el: ezen géntermékek a károsodott fehérjék lebontásában, transzport folyamatokban, a sejtek védekező mechanizmusában, transzkripcióban, a jelátviteli folyamatokban és a sejtek metabolizmusában szerepelhetnek.

A növények metabolizmusának ozmotikus stressz során létrejövő változásai régóta intenzív kutatás tárgyát képezik. A külső környezet ozmotikus potenciáljának változására adott, az élővilágban nagyon elterjedt válaszreakció az olyan metabolitok felhalmozása, amelyek „kompatibilis” ozmolitként hatnak (nem zavarják a biokémiai folyamatokat). Az ozmolitok szerkezetük alapján lehetnek aminosavak (prolin), gyűrűs poliolo (mioinozitol) és ezek metilált származékai (pinitol, ononitol), nem-gyűrűs poliolo (mannitol és szorbitol), kvaterner ammónium-származékok (betainok), tercier szulfónium-származékok (dimetil-szulfonio propionsav) és cukrok (trehalóz, fruktán, szacharóz). A kompatibilis ozmolitok hidrófil molekulák, ezen tulajdonságuk azt jelzi, hogy a fehérjék, fehérjekomplexek és membránok felszínén a vízmolekulákat helyettesíteni tudják. Így ozmoprotektánsként és kis molekulatömegű chaperonként hatnak, azonban hatásmechanizmusuk még nem teljesen felderített.

A prolin az egyik leggyakrabban előforduló ozmolit, amely felhalmozódik baktériumokban, moszatokban, gerinctelen állatokban és növényekben is víz-, illetve

sóstressz során. A baktériumoktól a magasabbrendű növényekig ismert az összefüggés a sejtek megnövekedett prolintartalma és a kedvezőtlen környezeti feltételek (szárazság, extrém hőmérsékleti viszonyok, nehézfém szennyezés, környezet megnövekedett só tartalma) alatti túlélőképessége között. Baktériumokban a prolin ozmoprotektáns anyagként működik és a prolin-túltermelő *E. coli* mutáns megnövekedett ozmotoleranciát mutat.

Növényekben prolin képzhető glutaminsavból és ornitinnal is. Ozmotikus stressz során a glutamát bioszintézis útján az elsődleges és kapcsolatban áll a *de novo* purin bioszintézissel. E reakcióút során a glutaminsav foszforilálódik és glutamil-5-szemialdehid (GSA) redukálódik. A reakciót egy kétfunkciós enzim, a  $\Delta^1$ -pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS) katalizálja. A P5CS enzimnek  $\gamma$ -glutamil-kináz ( $\gamma$ -GK) és GSA-dehidrogenáz aktivitása is van. A GSA spontán módon  $\Delta^1$ -pirrolin-5-karboxiláttá alakul, melyet a  $\Delta^1$ -pirrolin-5-karboxilát-reduktáz (P5CR) prolinná alakít. A folyamat sebességmeghatározó lépése a  $\gamma$ -glutamil kináz által katalizált reakció, melyet a prolin már viszonylag kis koncentrációban is gátol. A bioszintézisen kívül a lebontás is befolyásolja a szabad prolin szintjét. A prolin P5C-vé oxidálódik a növényi mitokondriumokban. Ezt a reakciót a prolin dehidrogenáz (PDH) katalizálja, mely a mitokondrium belső membránjának a mátrix felőli oldalán található. A keletkezett P5C glutaminsavvá alakítását a P5C dehidrogenáz (P5CDH) végzi. A prolin oxidációja gátolt az ozmotikus stressz során létrejövő prolinfelhalmozás során, és a reakció végbemegy a növények rehidratációja alatt. A stressz során létrejövő prolinfelhalmozás a bioszintézis aktiválódásából és ezzel együtt a lebontás gátlásából származik.

A prolin védi a membránokat és fehérjéket a magas inorganikus sókoncentráció és az extrém hőmérsékleti értékek károsító hatásaival szemben. Nehézfémek okozta oxidatív stressz során a keletkező szabadgyökök (főleg a hidroxilgyökök) eltávolításával védi a sejteket.

A  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  redox rendszernek fontos szerepe lehet az anyagcsere szabályozásában, mivel a  $\Delta^1$ -pirrolin-5-karboxilát és prolin közötti átalakulás közvetítheti a citoszolban található  $\text{NADPH}$ -ból származó redukáló erő elektron transzport láncba történő átvitelét. A prekursor és a végtermék közötti körforgás hozzájárulhat a redukáló erő sejtrészek közötti mozgásához, szállíthatja az elektronokat a  $\text{NADPH}$ -tól a  $\text{NADP}^+$ -re, összekapcsolhatja a  $\text{NADPH}$  oxidálását a mitokondriális elektrontranszporttal. Tehát lehetséges, hogy a prolin abszolút mennyiségénél fontosabb a bioszintézis és lebontás körforgása a környezeti stresszhatásokhoz való adaptálódásban, mivel ez hozzájárul a  $\text{NADP}^+$  szint fenntartásához. A többi ozmolitához hasonlóan a stresszhatás megszűnését követően a

prolin lebontása is szén-, nitrogén- és energiaforrássul szolgálhat a növekedés helyreállításához.

Ozmotikus stressz során a növényeknek különböző feladatokat ( pl. ozmolitok bioszintézise, víz- és ionháztartás egyensúlyban tartása, membrán transzport, sejtosztódás ) kell összehangolni. Ezen folyamatok megfelelő tér- és időbeli koordinációjához egy bonyolult, egymással kapcsolódó jelátviteli utak hálózatára van szükség, mely képes a külső környezetből érkező, illetve az endogén jelek érzékelésére és továbbítására. A fény és a patogén szignálok, a cukor és hormonok jelátvitelének kapcsolódásáról több közlemény is napvilágot látott. Számos cukor-inszenzitív mutáns ABA-rezisztensnek bizonyult, ami a cukor és ABA jelátviteli utak közötti kapcsolatra utal. A *prl1 Arabidopsis* mutáns hormonokra (ABA, etilén és auxin), hidegre és cukorra túlérzékeny. Továbbá számos fény-, szénhidrát represszió- (carbon catabolic repression), patogén- és környezeti faktorok által szabályozott gén transzkripcionális szinten derepresszált. A *prl1* mutáció pleiotróp hatása arra utal, hogy a *PRL1* gén által kódolt WD40 ismétlődést tartalmazó szabályozó fehérje működése szükséges a különböző környezeti hatásokra adott válaszokat szabályozó jelátviteli utak összehangolt működéséhez.

Ismert a fény prolin felhalmozódásra gyakorolt pozitív hatása. A fény-sötét ciklusnak megfelelő *AtP5CS1* mRNS-, illetve prolinszint oszcillálás felveti a fitokróm-jelátviteli folyamatokkal való kapcsolat lehetőségét. A *det2* és *cpd1* BR-deficiens *Arabidopsis* mutánsokban számos fény által szabályozott gén transzkripcionális szinten derepresszált. Ez arra utal, hogy a növényi szteroid hormonok is befolyásolják a környezeti stresszhatásokra adott válaszokat. Ezt támasztja alá, hogy a cukor- és ABA-hiperszenzitív *prl1 Arabidopsis* mutánsban számos fény-indukált, illetve cukor-represszált gén transzkripcionálisan derepresszált, míg a brassinoszteroid bioszintézishez szükséges *CPDI* gén expressziója pedig csökkent mértékű.

A környezeti hatásokra a növények részben a génexpressziós mintázatuk megváltoztatásával válaszolnak, mely végső soron sejt-, illetve növény szintű adaptív válaszokhoz vezet. Az abiotikus stresszhatásokra adott válaszreakciók fontos szabályozója az abszcizinsav (ABA) nevű növényi hormon. Az ABA részt vesz az alacsony hőmérsékletre, szárazságra és sóstresszre adott növényi válaszokban, valamint a növények növekedésének és fejlődésének számos folyamatát szabályozza (pl. embriófejlődés, magok nyugalmi állapotának kialakítása, gyökér- és hajtásnövekedés, levelek transpirációjának befolyásolása). A szárazság- és sóstressz a növényekben ABA felhalmozódást idéz elő, és az ABA-kezelés

génexpresszióra gyakorolt hatásai hasonlóak az ozmotikus stressz hatásaihoz, ezért az ABA közvetíti az ozmotikus stresszre adott válaszreakciók egy részét.

#### Célkitűzések

Dolgozatomban az *Arabidopsis thaliana* modellnövényben ozmotikus stressz során létrejövő prolin felhalmozódás tanulmányozásáról számolok be. Munkánk kezdetekor még nem volt ismert a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését kódoló gén *Arabidopsis thaliana*-ban, ezért a környezeti faktorok és hormonok prolinfelhalmozódást befolyásoló hatásainak tanulmányozása után munkánk célja a következő volt:

- a prolin bioszintézist szabályozó *P5CS* gén(ek) klónozása *Arabidopsis thaliana*-ból
- *AtP5CS* gén(ek) szekvencia analízise
- *AtP5CS* gén(ek) expressziós analízise:
  - Szövetspecifitás
  - Stressz-indukció
  - Hormon-szabályozás
  - „crosstalk” más környezeti faktorokkal
- promóter analízis

#### Alkalmazott módszerek:

- Molekuláris klónozási technikák,
- Transzgénikus *Arabidopsis* növények előállítása és nevelése steril és üvegházi körülmények között,
- GUS enzimaktivitás kvalitatív és kvantitatív meghatározása
- Össz RNS izolálása növényből
- Northern-hibridizáció
- Prolin meghatározás

## Eredmények és megvitatásuk

1. Megállapítottuk, hogy *Arabidopsis thaliana* modellnövényben NaCl-, mannitol-, glükóz- és ABA-kezeléssel a szabad prolin szintje jelentősen emelhető, és ezen emelkedés sötétadaptációval megakadályozható.
2. Kimutattuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal ellentétben *Arabidopsis*-ban két gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló kétfunkciós enzimet, a  $\Delta$ -<sup>1</sup>-pirrolin-5-karboxilát-szintetázt. Kimutattuk, hogy ez a két gén különböző kromozómán található. Szekvencia analízissel megállapítottuk, hogy a két *AtP5CS* cDNS 82 %-ban megegyezik, az 5', illetve a 3' nem-transzlálódó régiójuk kevésbé homológ. A két prediktált fehérje kináz és dehidrogenáz doméneket tartalmaz, valamint feltételezett ATP- és NADPH-kötő hely és egy leucinban gazdag régió is megtalálható. Továbbá a korábban *Vigna aconitifolia* P5CS enzimben azonosított, a prolin feed back gátlásban fontos aminosav is megtalálható mindkét prediktált *AtP5CS* enzimben.
3. Génexpressziós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a két *AtP5CS* gén eltérő szövetspecifitást mutat. Az *AtP5CS1* mRNS a legtöbb szervben (gyökér, levél, szár, virág) megtalálható, míg az *AtP5CS2* gén mRNS-ét főleg az aktívan osztódó sejtekben mutattuk ki (kallusz, sejtszuszpenziós kultúra). Ezen eredményeinket megerősítette az *AtP5CS1::GUS*, illetve az *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat hordozó transzgénikus növények GUS hisztokémiai analízise is.
4. Mindkét *AtP5CS* gén indukálható kiszárítással, NaCl-, illetve ABA-kezeléssel, azonban az indukció mértéke és időbeli lefutása eltérő. Az *AtP5CS1* gén indukciója általában nagyobb mértékű és gyorsabban bekövetkezik, mint az *AtP5CS2* gén esetében.
5. NaCl-kezelt *Arabidopsis* csíranövényekben az *AtP5CS* mRNS szintézise exponenciális görbe szerint történik. Eredményeink azt mutatják, hogy az indukció gyors, lineáris szakasza (mely 1 h-n belül létrejön és főleg az *AtP5CS1* gén indukciója jelenti) cikloheximiddel nem gátolható, és az *abal* mutánsban hiányzik. Tehát ez egy azonnali, ABA-által közvetített stresszválaszt jelent. A fehérjeszintézis cikloheximiddel történő gátlása megakadályozza az *AtP5CS1* mRNS szintjének a korai indukciót követő további

növekedését, és teljesen megakadályozza az *AtP5CS2* mRNS szintjének emelkedését a NaCl-kezelt csíranövényekben.

6. Az ABA bioszintézist, az ABA-érzékenységet, illetve különböző hormonok jelátviteli útját érintő mutációk *AtP5CS* génkifejeződésre gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy az ABA-t nem tartalmazó *aba1* mutánsban NaCl-kezelés hatására egyik *AtP5CS* gén sem indukálódott, jelezve az ABA abszolút szükségességét ezen gének indukciójában. Megállapítottuk, hogy nemcsak az ABA bioszintézis, hanem az ABA- és valószínűleg az auxin jelátviteli útjának bizonyos lépései (melyeket az *abi1-1* és *axr2* mutációk érintenek) szerepelnek az *AtP5CS* gének alapállapotú, illetve NaCl-indukált működésében.
7. Megállapítottuk, hogy a sötétadaptáció NaCl-, illetve ABA-kezelés hatására létrejövő prolin szint emelkedést gátló hatása az *AtP5CS1* gén aktivitásának csökkenésén, illetve egyidejűleg a *PDH* gén aktivitásfokozódásán keresztül valósul meg.
8. Kimutattuk, hogy a sötétadaptációhoz hasonlóan a brasszinolid-előkezelés is megakadályozza az *AtP5CS1* gén NaCl-, illetve ABA-által kiváltott indukcióját fényben és sötétben is. A brasszinolid *AtP5CS2* gént gátló hatása csak levelekben érvényesül. A *PDH* gén expresszióját nem befolyásolja a brasszinolid.
9. Az ABA-túlérzékeny *pr11* mutánsban nagyobb az *AtP5CS1* transzkript szintje NaCl-, illetve ABA-kezelést követően, mint a vad típusban. A brasszinoszteroid-hiányos *det2* mutáns esetében is emelkedett szintű transzkripciót tapasztaltunk az ABA-kezelést követően. A *pr11* és *det2* mutánsokban tapasztalt emelkedett szintű *AtP5CS1* transzkripció hatására ezen mutánsokban a vad típusal összehasonlítva magasabb volt a szabad prolin szintje NaCl-, illetve ABA-kezelés hatására. A *det2* és *pr11* mutációk nem csökkentették a BR előkezelés *AtP5CS1* transzkripcióra gyakorolt gátló hatását. Az *AtP5CS2* transzkripciója némileg magasabb volt a *det2* mutánsban, és ezt is gátolta a BR előkezelés. A *PDH* mRNS szintjét a BR előkezelés némileg csökkentette a vad típusú növényekben. A *pr11* és *det2* mutánsokban kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk.

10. Megállapítottuk, hogy *prl1* mutáns háttérben a megnövekedett *AtP5CS1* transzkripcióhoz hasonlóan az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukció működése is emelkedett volt, melyet brasszínoliddal részlegesen gátolni lehetett. A *prl1* mutáció csekély változást okozott az *AtP5CS2::GUS* riporter konstrukció működésében.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal ellentétben az *Arabidopsis thaliana*-ban két, eltérő szövetspecititással és eltérő szabályozás alatt működő *AtP5CS* gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését és ezen gének transzkripcionális szintű szabályozása döntő mértékben befolyásolja az ozmotikus stressz során létrejövő prolin felhalmozódást.

#### Publikációs lista

A dolgozat alapját képező publikációk:

Strizhov, N., **Ábrahám**, E., Ökrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, Cs., Szabados, L. (1997) Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABAI*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 12(3): 557-569

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

Egyéb publikációk:

Szabados, L., Kovács, I., Oberschall, A., **Ábrahám**, E., Kerekes, I., Zsigmond, L., Nagy, R., Alvarado, M., Krasovskaja, I., Gál, M., Berente, A., Rédei, G. P., Ben-Haim, A., Koncz, C. (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant Journal* 32: 233-242.



Szabados, L., **Abraham E.**, Okresz, L., Strizhov, N., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C. (1998) Structure, function and regulation of *AtP5CS* genes in *Arabidopsis*. *Biotechnology & Biotech Equipment*. 12: 3-10.

Szabados, L., Kovacs, I., **Abraham, E.**, Oberschall, A., Nagy, R., Zsigmond, L., Krasovskaja, I., Kerekes, I., Amit Ben-Haim, Koncz, Cs. (2000): *Arabidopsis* genome project in Hungary: generating T-DNA tagged *Arabidopsis* genes. FEPPS 2000, *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 38 S10-03L (absztrakt)

**Ábrahám, E.**, Király, A., Rigó, G., Koncz, Cs., Szabados, L., (2000) Transcriptional control of *AtP5CS1* and *AtP5CS2* genes. FEPPS 2000 *Plant Physiol. Biochem.* 38:S61. (absztrakt)