

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

Ph.D. értekezés

Készítette: Temesváriné Ábrahám Edit

Témavezetők: Dr. Szabados László és Dr. Koncz Csaba

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet

Szeged

2004

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A növények ozmotikus stresszre adott válaszreakciói	7
2.2. Ozmotikus stressz során bekövetkező metabolikus változások	9
2.2.1. Ozmolitok funkciói.....	9
2.2.2. A leggyakrabban előforduló ozmolitok	10
2.2.3. Prolin, mint ozmolit előfordulása	11
2.2.4. A prolin bioszintézise, lebontása és transzportja	12
2.2.5. Az ozmotikus stressz során felhalmozódó prolin szerepe	15
2.2.6. Prolin szerepének megismerése génmódosított növények felhasználásával ...	16
2.3. Jelátviteli folyamatok az ozmotikus stressz során	18
2.3.1. Abiotikus stressz szignálok érzékelése	18
2.3.2. Jelátviteli utak közötti kapcsolat	21
2.4. Hormonok szerepe az ozmotikus stressz során	23
2.4.1. Abszcizinsav	23
2.4.2. Brasszinoszteroidok szerepe	25
3. Célkitűzések	27
4. Anyagok és módszerek	28
4.1. <i>Arabidopsis</i> ökotípusok és mutánsok	28
4.2. <i>Arabidopsis</i> nevelési körülményei	28
4.3. Növények kezelése	29
4.4. <i>Arabidopsis</i> vákuum infiltrációs transzformálása	30
4.5. Molekuláris biológiai alapszerek	31
4.6. Southern hibridizáció	31
4.7. Vektorkonstrukciók létrehozása	31
4.8. GUS enzimaktivitás meghatározása	32
4.9. Össz RNS izolálása növényekből	33
4.10. Northern-analízis.....	34
4.11. Prolin meghatározás.....	35
5. Kísérleti eredmények.....	37
5.1. Környezeti faktorok és hormonok prolin felhalmozódásra gyakorolt hatása	37
5.2. <i>P5CS</i> gén izolálása, szekvencia analízise és térképezése	39
5.2.1. Az <i>Arabidopsis P5CS</i> gén klónozása.....	39
5.2.2. Az <i>AtP5CS</i> gén szekvencia analízise.....	39
5.2.3. <i>AtP5CS</i> gén térképezése.....	41
5.3. Génexpresszió vizsgálata Northern hibridizációval.....	43
5.3.1. <i>AtP5CS</i> gén szövet-specifikus expressziójának vizsgálata	43
5.3.2. Környezeti faktorok hatása az <i>AtP5CS</i> gén expressziójára.....	44
5.3.3. Hormonok hatása az <i>AtP5CS</i> gén kifejeződésére	46
5.3.4. Az <i>AtP5CS</i> gén vizsgálata <i>Arabidopsis</i> mutánsokban.....	47
5.3.5. Fehérjeszintézis gátlásának hatása az <i>AtP5CS</i> gén NaCl-okozta indukciójára	49
5.3.6. Sötétadaptáció hatása a prolin metabolizmus enzimeit kódoló gén kifejeződésére	50
5.3.7. 24-epibrassinolid hatásának vizsgálata	51

5.4.	<i>AtP5CS1</i> és <i>AtP5CS2</i> promóterek jellemzése	53
5.4.1.	<i>AtP5CS</i> promóterek szekvencia analízise.....	53
5.4.2.	Az <i>AtP5CS1</i> és <i>AtP5CS2</i> promóterek működésének vizsgálata GUS hisztokémiai analízissel	54
5.4.3.	<i>AtP5CS1::GUS</i> és <i>AtP5CS2::GUS</i> riporter génkonstrukciók tanulmányozása fluorimetriás enzimaktivitás meghatározással	56
5.5.	Az emelkedett <i>AtP5CS1</i> transzkripció hatása a növények szabad prolin szintjére	59
6.	Eredmények értékelése	61
6.1.	Környezeti faktorok és hormonok hatása a prolin felhalmozódásra	61
6.2.	<i>P5CS</i> gének klónozása, szekvencia analízise és térképezése	61
6.3.	Az <i>AtP5CS</i> gének szövetspecifikus expressziójának vizsgálata	62
6.4.	Környezeti faktorok hatása az <i>AtP5CS</i> gének expressziójára	63
6.5.	Hormonok hatása az <i>AtP5CS1</i> és <i>AtP5CS2</i> génekre	64
6.6.	Az ABA bioszintézisét, valamint a hormon-érzékenységet érintő mutációk hatása az <i>AtP5CS</i> génekre	65
6.7.	Fehérjeszintézis gátlásának hatása	66
6.8.	Sötétadaptáció hatása	67
6.9.	24-epibrassinolid hatása	68
6.10.	<i>AtP5CS1</i> és <i>AtP5CS2</i> promóterek szekvencia analízise	69
7.	Összefoglalás	71
8.	Köszönetnyilvánítás	73
9.	Irodalmi hivatkozások jegyzéke	74
10.	Ph.D thesis	92
11.	Publikációs lista	98

Rövidítések jegyzéke

ABA	abszcizinsav
ABI	abszcizinsav érzéketlen : abscisic acid insensitive
AXR2	auxin rezisztens 2: auxin resistant 2
BAP	6-benzilaminopurin
BR	24-epibrassinolid
CHX	cikloheximid
<i>det2</i>	deetioltalt 2: deetiolated 2
γ -GK	γ -glutamil kináz
GSA	glutamil-szemialdehid
GSA-DH	glutamil-szemialdehid-dehidrogenáz
GUS	β -glükuronidáz
2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
P5C	Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát
P5CS	Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintetáz
P5CR	Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-reduktáz
P5CDH	Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-dehidrogenáz
PDH	prolin dehidrogenáz
ROS	szabadgyök: reactive oxygen species
YAC	élesztő mesterséges kromoszóma: yeast artificial chromosome
SDS	nátrium-lauril-szulfát
X-gluc	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glükuronid

1. Bevezetés

A növényeket folyamatosan olyan környezeti hatások érik, amelyek befolyásolják növekedésüket, fejlődésüket és meghatározzák termőképességüket. A különböző növényfajoknál különböző küszöbérték felett ezen hatások stressz faktorrá válnak: az extrém hőmérsékleti értékek, anaerobiózis, tápanyaghiány, nem megfelelő fényviszonyok stb. csökkentik a termőképességet.

A mezőgazdasági termelést akadályozó környezeti tényezők közül világviszonylatban is a szárazság, a termőterületek sótartalmának növekedése és a hideg a legfontosabb. Mindhárom stressztényezőben közös az ozmotikus nyomás megváltozása, ami károsítja a növények sejtjeit (ozmotikus stressz). Ezért a mezőgazdasági termelésbe bevont növényfajok ozmotikus stresszel szembeni ellenállóképességének javítása fontos nemesítői feladat. A hagyományos nemesítői módszerekkel nem lehet bizonyos genetikai korlátokat átlépni, a génátvitel nem-rokon fajok között akadályokba ütközik. A molekuláris biológia és biotechnológia fejlődésével sok mezőgazdasági haszonnövény genetikai módosítása lehetővé vált. Ez új lehetőséget jelent a kutatók számára a növények tulajdonságainak javítását célzó munkában.

Régóta ismert, hogy a növények túlélési képességét az állandóan változó környezetben számos gén befolyásolja. Ez a többgénes jelleg jelenti a legnagyobb akadályt a mezőgazdasági haszonnövények stressztűrésének javítását célzó munkában. Egyre több bizonyíték utal egy általános stresszválasz rendszer meglétére növényekben. A növények különböző környezeti stresszhatásokra adott, gyakorta átfedő válaszait közös jelátviteli utak közvetíthetik. A stressz érzékelésében és a stressztűrés kifejeződését befolyásoló molekuláris szintű folyamatokban szereplő komponensek jobb megismerése által lehetővé válhat a környezeti stresszhatásoknak jobban ellenálló növények létrehozása.

Az ozmotikus stressz bonyolult válaszreakciót vált ki a növényekben, mely a stressz érzékelésével kezdődik és egy jelátviteli rendszeren keresztül molekuláris, sejt szintű és fejlődési válaszreakciók megjelenését eredményezi. Az ozmotikus stresszre a különböző növényfajok eltérő módon és különböző hatásfokkal reagálnak. Az egyik leggyakrabban előforduló metabolikus válaszreakció az ozmoprotektív molekulák megnövekedett szintézise. Ezen molekulák tartják bizonyos határok között egyensúlyban az ozmotikus potenciált. Ebbe a csoportba tartozik a betain típusú molekulák, cukrok és szerves savak mellett a prolin is. Az ozmotikus stressz során megfigyelhető prolinfelhalmozódást sok növényfajban, baktériumokban, moszatokban és gerinctelen állatokban is leírták. A

prolinfelhalmozást abszcizinsav-függő és abszcizinsav-független szignálátviteli utak is befolyásolják, azonban a stressz érzékelése és a prolin bioszintézisben résztvevő gének indukciója közötti lépések még alig ismertek.

Az evolúció során a virágos növények (ebbe a csoportba tartoznak a termesztett növények is) viszonylag kései megjelenése azt is jelenti, hogy a különböző fajokból izolált gének közötti hasonlóság nagy. Emiatt a modellnövényekből izolált gének hasznosak lehetnek a mezőgazdaságilag fontos növényekkel végzett nemesítői munkában. Munkám során modellnövényül az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) szolgált. Kicsi mérete, rövid élettartama, jól ismert genetikája, kicsi genom mérete miatt kiváló kísérleti növény a molekuláris biológiai kutatásokban.

Jelen dolgozatomban az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében Dr. Szabados László és Dr. Koncz Csaba irányításával az *Arabidopsis* Molekuláris Genetikai Csoportban végzett munkámról számolok be. Dolgozatom témája az egyik legjellegzetesebb ozmotikus stresszválasz, a prolin felhalmozódás tanulmányozása *Arabidopsis thaliana*-ban.

2. Irodalmi áttekintés

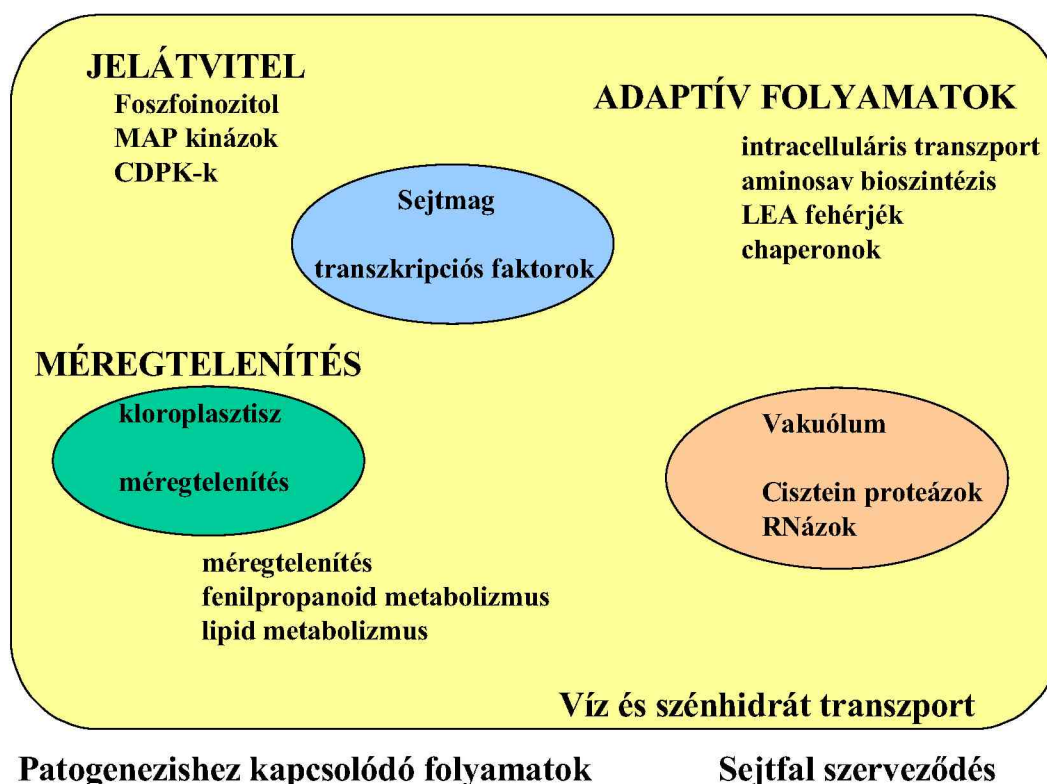
2.1. A növények ozmotikus stresszre adott válaszreakciói

A szárazföldi növények helyhezkött életmódjuk miatt gyakran szenvednek az állandóan változó környezeti feltételektől. Ezek közül a növények számára hozzáférhető víz mennyiségének csökkenése a legfontosabb korlátozó tényező. A szárazság, a vízben található oldott só mennyiségének növekedése és a hideg is az ozmotikus nyomás megváltozása által károsítja a növényeket. A növények adaptív mechanizmusokat fejlesztettek ki a túlélés érdekében. Ezek közé tartoznak morfológiai és fejlődésbeli változások (pl. az életciklus rövidülése kedvezőtlen környezeti feltételek között, a hajtás növekedésének gátlása és a gyökérzet növekedésének elősegítése). Az ionok transzportjában (pl. az ionok felvételében és kiválasztásában) és a metabolizmusban is változások történnek (pl. kompatibilis ozmolitok szintézise). A növények morfológiai adaptációja nagyon fontos lehet az adott faj számára, azonban nem általánosan elterjedt a növényvilágban. Az alapvető sejt szintű ozmotikus válaszreakciók azonban (mint pl. az ozmolitok szintézise) konzerváltak a növényfajok között.

A növényekben az evolúció során kialakult számos élettani és biokémiai védekező mechanizmus működését a génexpressziós mintázat jelentős átalakulása biztosítja. Seki és mtsai (2001) beszámoltak egy microarray technika felhasználásával elvégzett kísérletről, melynek során a felhasznált 1300 cDNS közül 44 expressziós szintje emelkedett vízvesztés hatására. Ezek jelentős része korábban ismeretlen volt. Az aktiválódott gének egy részének nincs szerepe az adaptációban, hanem a stressz által okozott károsodás miatt aktiválódtak. A vízvesztés során indukálódó gének termékei többféle funkciót látnak el. Az 1. ábrán látható a vízvesztés során aktiválódó gének által kódolt fehérjék funkció szerinti csoportosítása.

Ozmotikus stressz során a fehérjék gyakran aggregálódnak, illetve megsérülnek. Ezért szükség van ezen fehérjék konformációját helyreállító chaperonokra, illetve a sérült fehérjék lebontását végző proteázokra. Microarray adatokból ismert, hogy vízhiány során chaperonokat, proteázokat és proteáz inhibitorokat kódoló gének aktiválódnak (Bray, 2002).

A vízvesztés hatására indukálódó transzportfolyamatokban szereplő fehérjék közül legfontosabbak az aquaporinok. A sejtes vízszállítás fontos elemei az aquaporin fehérjék, amelyek a csatornafehérjék komplex családját képezik. Ezen fehérjék a víz mozgását segítik elő a transzmembrán vízpotenciál grádiensek mentén. Az aquaporinok szabályozhatják a membránok hidraulikus konduktivitását és akár 10-20-szoros növekedést idézhetnek elő a membránok vízpermeabilitásában (Maurel és Crispel, 2001).



1. ábra Vízvesztés során aktiválódó gének által kódolt fehérjék funkció szerinti csoportosítása (Bray, 2002).

Az ozmotikus stressz következtében oxidatív stressz is létrejön, amelyet a nagy mennyiségben keletkező szabadgyökök okoznak. A normál biokémiai folyamatok során is képződnek reaktív oxigénfajták (pl. a fénylégzés során és a zsírsavak β -oxidációjakor). Biotikus és abiotikus stressz körülmények között mennyiségük jelentősen emelkedik. Szárazság stressz során a szabadgyökök eltávolításában szerepet játszó enzimek aktivitása emelkedik és ez összefüggésben lehet a növények megnövekedett szárazságtűrésével (Bowler és mtsai, 1992). A gyökfogó enzimeket kódoló gének jelentős részének kifejeződését befolyásolják a különböző stressztényezők, illetve az abszcizinsav (Guan és Scandalios, 1998).

Az ozmotikus stressz és ABA-kezelés hatására felhalmozódó fehérjék egyik nagy csoportját jelentik az ún. LEA (Late Embryogenesis Abundant: késői embriógenézis során előforduló) fehérjék. A LEA fehérjék széleskörűen előfordulnak az egy- és kétszikű növények

között. Ezen fehérjékre a nagyfokú hidrofilitás és vízdékonyság jellemző. Funkciójuk még nem ismert pontosan, valószínűleg a citoplazma makromolekuláinak védelmében szerepelnek (Ramanjulu és Bartels, 2002).

2.2. Ozmotikus stressz során bekövetkező metabolikus változások

Régóta ismert, hogy a növényi sejtek metabolizmusa a vízhiány által befolyásolt (Hsiao, 1973), azonban sokáig nem volt ismert, hogy a vízhiány során megfigyelt metabolikus változások mely részének van szerepe a stresszhez való alkalmazkodásban és mely része jön létre a károsodás következtében. Intenzív kutatás tárgyát képezik a fotoszintézisben, a szén- és nitrogén felhasználásban, illetve a kis molekulatömeg kompatibilis ozmolitok szintézisében szereplő enzimeket kódoló gének. Ezek közül részletesen az egyik legáltalánosabban előforduló ozmotikus stresszválaszról, az ozmolitok felhalmozódásáról lesz szó.

2.2.1. Ozmolitok funkciói

A citoszolban található töltéssel rendelkező részecskék mennyiségének növekedése megváltoztathatja a makromolekulák hidrátburkát, befolyásolva ezzel azok konformációját és a töltésviszonyaikat. A kompatibilis ozmolitok fontos szerepet játszhatnak a makromolekulák konformációjának fenntartásában. A külső környezet ozmotikus potenciáljának változására adott, az élő világban nagyon elterjedt válaszreakció az olyan metabolitok felhalmozása, amelyek "kompatibilis" ozmolitként hatnak (azaz nem zavarják a biokémiai folyamatokat). Az ozmolitok szerkezetük alapján lehetnek aminosavak (prolin), gyűrűs poliolok (mioinozitol) és ezek metilált származékai (pinitol, ononitol), nem-gyűrűs poliolok (mannitol és szorbitol), kvaterner ammónium-származékok (betainok), terciár szulfónium-származékok (dimetil-szulfonio propionsav) és cukrok (trehalóz, fruktán, szacharóz). Ezen ozmolitok felhalmozása elősegíti az "ozmotikus kiigazítást" a belső ozmotikus potenciál csökkentésével és hozzájárul az élő lények stressztoleranciájához (Delauney és Verma, 1993). A kompatibilis ozmolitok hatásmechanizmusa még nem teljesen felderített. A kompatibilis ozmolitok hidrofíl molekulák, ezen tulajdonságuk azt jelzi, hogy a fehérjék, fehérjekomplexek és membránok felszínén a vízmolekulákat helyettesíteni tudják. Így ozmoprotektánsként és kis

molekulatömeg chaperonként hatnak. A kompatibilis ozmolitok csökkenteni tudják a toxikus ionok enzimaktivitást gátló hatását (Brown, 1990). Megnövelik az enzimek hőstabilitását (Galinski, 1993) és megakadályozzák az enzimkomplexek szétesését, mint pl. a II-es fotokémiai rendszer oxigén-felszabadító enzimkomplexe (Papageorgiou és Murata, 1995). Gyakran a felhalmozódás mértéke nem elegendő ahhoz, hogy hozzájáruljon az ozmotikus kiigazításhoz, azonban a fehérjék és membránok felületén a helyi koncentrációjuk fontosabb lehet, mint az abszolút mennyiségük. Egyes kutatók szerint az ozmolitoknak fontosabb szerepük van pl. a szabadgyökök eltávolításában, mint az ozmotikus kiigazításban (Ramanjulu és Bartels, 2002; Hong és mtsai, 2000). Greenway és Munns (1980) szerint az ozmolitok szén- és nitrogén forrásként szolgálhatnak a stressz megszűnését követően, mivel könnyen mozgósítható redukáló erőket jelentenek. Mutáns növények analízisével és genetikailag módosított növények molekuláris és biokémiai tanulmányozásával újabb bizonyítékok láttak napvilágot az ozmolitok funkcióját illetően. A nagyobb mértékű ozmolitfelhalmozás érdekében létrehozott génmódosított növények általában a vártnál kisebb mértékben halmozták fel ezen anyagokat és abiotikus stressz körülmények között nem mindig mutattak jobb növekedést. Az irodalomban ezzel kapcsolatban található közlemények ellentmondásos volta jelzi, hogy az ozmolitok szerepe a stressztoleranciában nem írható le csupán az ozmotikus kiigazításhoz való hozzájárulással. Az a biokémiai reakcióút, amely egy adott ozmolit-hoz vezet, fontosabb lehet, mint maga a felhalmozódás. Pl. a prolin bioszintézis és lebontás enzimeinek szabályozott kifejeződése jelzi, hogy a prekursor és a termék közötti körforgás fontos lehet (Verbruggen és mtsai, 1996).

2.2.2. A leggyakrabban előforduló ozmolitok

A trehalóz (nem-redukáló diszacharid) gyakran magas koncentrációban fordul elő baktériumokban, gombákban és olyan élőlényekben, melyek képesek a teljes kiszáradást túlélni ("feltámadó" növények: resurrection plant: Goddijn és van Dun, 1999). A trehalóz *in vitro* képes dehidratált enzimeket és membránokat stabilizálni (Colaco és mtsai, 1992). Azonban a trehalóz túltermeltetésére létrehozott génmódosított növényekben a trehalóz szintje alacsonyabb volt a vártnál (valószínűleg a trehalóz lebontása miatt) és megváltozott a növények morfológiája és cukor metabolizmusa (Goddijn és mtsai, 1997).

A glicin betain (GB: N,N,N-trimetil glicin) széles pH tartományban elektromosan semleges. Vízben nagyon jól oldódik, bár tartalmaz egy 3 metilcsoportból álló apoláris

molekularészt is. A GB kölcsönhatásba tud lépni a makromolekulák hidrofíli és hidrofób doménjeivel is. *In vitro* kísérletekből ismert, hogy a GB nemcsak ozmolitként hat, hanem stabilizálja az enzimek és fehérjekomplexek szerkezetét és védi a membránok integritását a magas sókoncentráció, hideg és meleg károsító hatásaitól (Gorham, 1995). Számos közlemény számol be olyan kísérletekről, amelyekben a növények stressztűrő képességét a glicin-betain túltermeltetésével próbálták fokozni (Sakamoto és Murata, 2001). Több közleményben is szerepel, hogy a létrehozott genetikailag módosított növényekben a GB koncentrációja alacsony volt ahhoz, hogy védőhatását ozmoregulátorként fejtsse ki.

Cukor-alkohol típusú molekulák, pl. a mannitol túltermeltetésére is történtek kísérletek. Tarzynski és mtsai (1993) által létrehozott, az *E. coli mtlD* (mannitol-1-foszfát dehidrogenáz) génjét hordozó transzgénikus dohánynövények mannitolt halmoztak fel és sótűrésük megnőtt. Azonban Karakas és mtsai (1997) szerint ezen transzgénikus növények és a vad típusú növények szárazságstressz során hasonlóan viselkedtek.

2.2.3. Prolin, mint ozmolit előfordulása

A prolin az egyik leggyakrabban előforduló ozmolit, amely felhalmozódik baktériumokban, moszatokban, gerinctelen állatokban és növényekben is víz-, illetve sóstressz során (Csonka, 1989; Delauney és Verma, 1993, Yoshida és mtsai, 1995). A baktériumoktól a magasabbrendű növényekig ismert az összefüggés a sejtek megnövekedett prolin tartalma és a kedvezőtlen környezeti feltételek (vízhiány, extrém hőmérsékleti viszonyok, nehézfém szennyezés, környezet megnövekedett sótartalma) közötti túlélőképessége között. Baktériumokban a prolin ozmoprotektáns anyagként működik és a prolin-túltermelő *E. coli* mutáns megnövekedett ozmotoleranciát mutat (Csonka, 1989). A baktériumok citoplazmájában bekövetkező prolin felhalmozódást az egyéb oldott anyagok koncentrációjának csökkenése, valamint a citoplazmatikus víz térfogatának emelkedése kíséri (Cayley és mtsai, 1992). A prolinról régóta feltételezik, hogy kompatibilis ozmolitként csökkenteni tudja az ozmotikus stressz károsító hatásait (Delauney és Verma, 1993).

Számos magasabbrendű halofita növény leveleiben prolin halmozódik fel (Briens és Larher, 1982), továbbá vízhiánynak kitett növények leveleiben és a hajtások apikális merisztémáiban is megfigyelhető a szabad prolin szintjének emelkedése (Boggess és mtsai, 1976; Jones és mtsai, 1980). Pollenben (Lansac és mtsai, 1996), alacsony vízpotenciál mellett növekvő gyökerek apikális régiójában (Voetberg és Sharp, 1991), NaCl-stresszhez adaptált

növényi sejtszuspenziós kultúrában (Thomas és mtsai, 1992) is végbemegy a prolin felhalmozódása. Cu- és Zn-kezelés hatására *Scenedesmus* fajokban és *Brassica juncea* növényekben is prolin halmozódik fel (Tripathi és Gaur, 2004; Singh és Tevari, 2003). Három, hazánk szikes talajain megtalálható halofita növényfajban (*Lepidium crassifolium*, *Camphorosma annua*, *Limonium gmelini* subsp. *hungaricum*) az egyéb kompatibilis ozmolitok mellett a prolin felhalmozódása figyelhető meg, mely szezonális váltakozást mutat (Muraközy és mtsai, 2003).

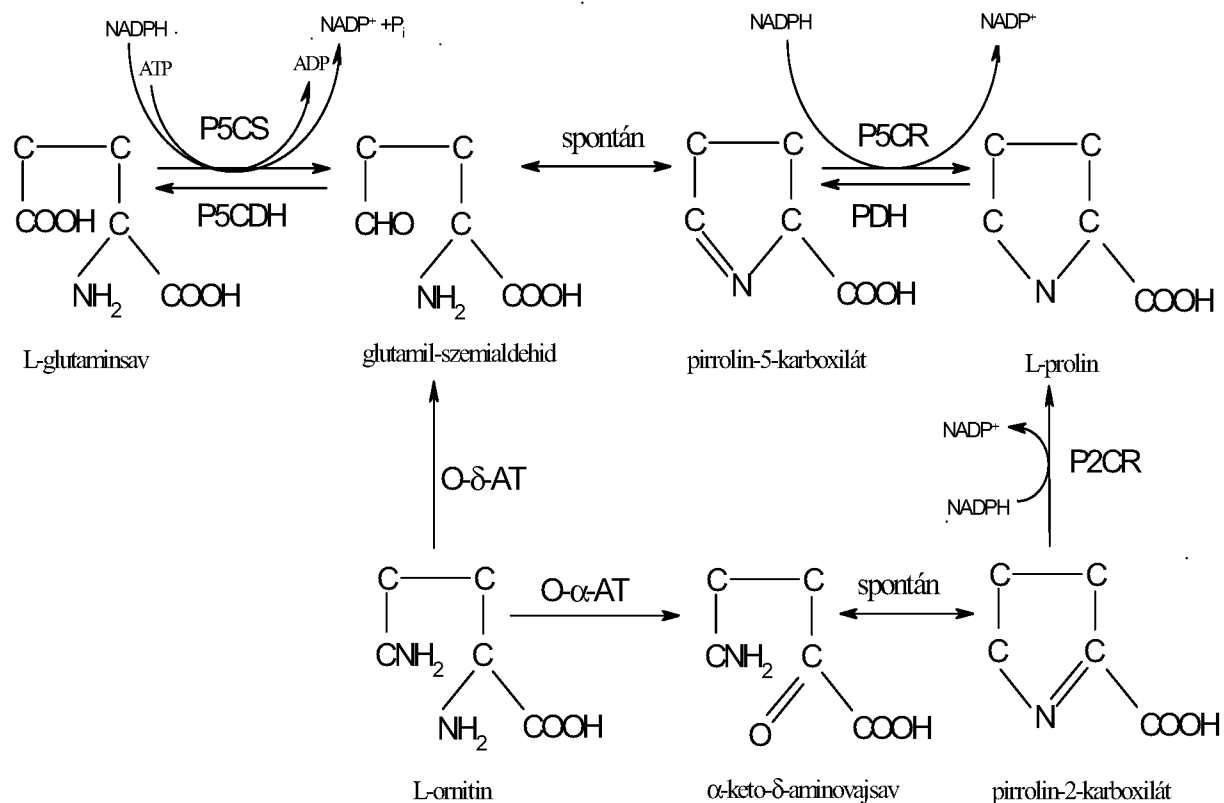
2.2.4. A prolin bioszintézise, lebontása és transzportja

A baktériumokban végbemenő prolin bioszintézis az L-glutaminsav γ -karboxilcsoportjának ATP-függő foszforilálásával kezdődik. Ezt az irreverzibilis reakciót a *proB* gén által kódolt γ -glutamil kináz katalizálja. A keletkező γ -glutamil-foszfát rendkívül instabil, melyet a *proA* gén terméke, a glutamil-szemialdehid-dehidrogenáz átalakít glutamil-szemialdehiddé (GSA). A GSA spontán és reverzibilis módon ciklizálódik, így Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát (P5C) keletkezik. A P5C-t a *proC* gén által kódolt pirrolin-5-karboxilát reduktáz (P5CR) alakítja prolinná (Adams és Frank, 1980).

Növényekben a NaCl- és vízstressz során végbemenő prolin felhalmozás sebességmeghatározó lépésének meghatározása régóta foglalkoztatta a kutatókat (Delauney és Verma, 1993). Mivel a baktériumokban végbemenő prolin bioszintézis már ismert volt, ezért a prolin bioszintézis különböző lépéseiben mutációt hordozó baktérium törzseket használtak a megfelelő növényi gének izolálásához. Delauney és Verma (1990) az *E. coli proC* mutáns funkcionális komplementálásával izolált egy Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-reduktázt (P5CR) kódoló, szójából származó cDNS-t. Ezt követően borsóból és *Arabidopsis*-ből is izoláltak P5CR-t kódoló gént (Williamson és Slocum, 1992; Verbruggen és mtsai, 1993). Baktériumokban már ismert volt, hogy a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését a γ -glutamil-kináz aktivitás jelenti, melyet a prolin feed back gátol. Mivel feltételezték, hogy ez növényekben is igaz, ezért az *E. coli proB* gén (mely γ -glutamil-kinázt kódol) mutációjának komplementálásával próbálták a prolin bioszintézis hasonló lépését katalizáló enzimet kódoló gént izolálni. Először *Vigna aconitifolia*-ból sikerült egy cDNS-t izolálni, amely egy kétfunkciós enzimet kódolt. A P5CS fehérjének γ -glutamil-kináz (γ -GK) és glutamil- γ -szemialdehid dehidrogenáz (GSA-DH) doménje volt (Hu és mtsai, 1992).

A növényekben végbemenő prolin metabolizmus a 2. ábrán látható. Prolin képződhet glutaminsavból és ornitinből is. Ozmotikus stressz során a glutamát bioszintézisút az elsődleges és kapcsolatban áll a *de novo* purin bioszintézissel (Delauney és Verma, 1993). Közvetett bizonyítékok alapján már az 1980-as években feltételezték a baktériumokéhoz hasonló, glutaminsavból kiinduló bioszintézisút meglétét növényekben is (Adams és Frank, 1980). E reakcióút során a glutaminsav foszforilálódik és glutamil-szemialdehiddé (GSA) redukálódik. A reakciót egy kétfunkciós enzim, a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS) katalizálja. A P5CS enzimnek γ -glutamil-kináz (γ -GK) és GSA-dehidrogenáz aktivitása is van (Hu és mtsai, 1992). A GSA spontán módon Δ^1 -pirrolin-5-karboxiláttá alakul, melyet a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-reduktáz (P5CR) prolinná alakít (Delauney és mtsai, 1993). A folyamat sebességmeghatározó lépése a γ -glutamil kináz által katalizált reakció, melyet a prolin már viszonylag kis koncentrációban is feed-back gátol (Csonka, 1989; Zhang és mtsai, 1995). Ez a tulajdonság felhasználható a megnövekedett ozmotikus stressz toleranciát mutató növények előállításában. A *Vigna aconitifolia* P5CS génjében a feed back gátlásért felelős szakasz helyspecifikus mutagenézissel történő megváltoztatásával előállított mutáns gén által kódolt fehérje dohányban való túltermeltetése kb. kétszer több prolin felhalmozódásához vezetett. Ezen transzgénikus csíranövények 200 mM NaCl-t tartalmazó táptalajon növekedni tudtak, valamint ezen csíranövényekben a szabadgyökök mennyisége is csökkent volt (Hong és mtsai, 2000). Irodalmi adatok szerint *Arabidopsis*-ban a prolinfelhalmozás követi a P5CS gén expressziójának emelkedését só- és abszcizinsav-kezelés hatására (Yoshida és mtsai, 1995), míg az említett kezeléseknél nincs egyértelmű hatása a P5C reduktáz expressziójára. Ezért úgy tűnik, a stressz-indukálta prolinfelhalmozást főleg a P5CS gén expressziója szabályozza.

A növények ornitinből is szintetizálhatnak prolint, kétféle reakcióúton keresztül. Az ornitin α -aminocsoportjának transzaminálódásával α -keto- δ -aminovajsav keletkezik, amely Δ^1 -pirrolin-2-karboxilsavvá (P2C) való ciklizálódás után prolinná redukálódik. A másik reakcióút során a δ -aminocsoport transzaminálódása után GSA keletkezik, amely P5C-n keresztül prolinná alakul. Delauney és mtsai (1993) beszámoltak a *Vigna aconitifolia*-ból származó ornitin aminotranszferáz cDNS izolálásáról és megállapították, hogy ez a cDNS egy δ -aminotranszferázt kódol, bizonyítva ezzel a P5C-n át való prolin szintézist. *Arabidopsis*-ból is izoláltak ornitin- δ -aminotranszferázt (Roosens és mtsai, 1998).



2. ábra A prolin bioszintézise és lebontása növényekben

P5CS: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintetáz; P5CR: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát reduktáz P2CR: Δ^1 -pirrolin-2-karboxilát reduktáz; PDH: prolin dehidrogenáz; P5CDH: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát dehidrogenáz; O- α -AT: ornitin- α -aminotranszferáz; O- δ -AT: ornitin- δ -aminotranszferáz

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 PDH közvetlenül elektronokat ad a légzési elektron transzport láncba (Elthon és Stewart, 1981). 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 során (Peng és mtsai, 1996). A stressz során létrejövő prolinfelhalmozás a bioszintézis aktiválódásából és ezzel együtt a lebontás inaktíválódásából származik.

Növényekben a szabad prolin szintjét a metabolizmuson kívül a transzport is befolyásolja. Magasabbrendű növényekben a transzportfolyamatok fontos szerepet játszanak a nitrogén továbbításban, stressz körülmények között nagymértékű változások történnek a C és N elosztásban. Hare és Cress (1997) feltételezése szerint a prolin szervek közötti transzportja képes összehangolni az egyes szövetek eltérő ozmotikus és metabolikus igényeit. *Arabidopsis*-ban két prolin-specifikus transzportert, a *ProT1*-t és a *ProT2*-t klónoztak meg (Rentsch és mtsai, 1996). A *ProT1* gén legerősebben a virágban expresszálódik és a megtermékenyülés után csökken az expressziója. A *ProT2* gén só-, illetve vízstressz során erősen indukálódik, míg a *ProT1* expressziója nem változik (Rentsch és mtsai, 1996). Mindkét specifikus prolin transzporter kifejeződik gyökérben, ami összhangban van a feltételezéssel, mely szerint a növények gyökerei fontos prolin bioszintézis helyek, ahonnan a képződött prolin a hajtásokba kerül (Hua és mtsai, 1996). Sóstressz során a *ProT2* viszonylag gyorsan indukálódik, ami a stressz körülmények közötti prolin transzport fontosságára utal.

2.2.5. Az ozmotikus stressz során felhalmozódó prolin szerepe

A prolin védi a membránokat és fehérjéket a magas inorganikus sókoncentráció és az extrém hőmérsékleti értékek károsító hatásaival szemben (Santarius és mtsai, 1992; Songstad és mtsai, 1990). Magasabbrendű növényekben a külsőleg alkalmazott prolin ozmoprotektív hatású lehet (Handa és mtsai, 1986).

Vigna radiata növényekben az alkalmazott nehézfémkoncentrációval arányos mennyiségű prolin halmozódott fel, amely növelte a növények túlélőképességét a stressz során (Singh és Tewari, 2003). Tripathi és Gaur (2004) szerint a prolin a nehézfémek okozta oxidatív stressz során a keletkező szabadgyökök (főleg a hidroxilgyökök) eltávolításával védi a sejteket.

Hare és Cress (1997) feltételezése szerint a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ redox rendszernek fontos szerepe lehet az anyagcsere szabályozásában, mivel a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát és prolin közötti átalakulás közvetítheti a citoszolban található NADPH-ból származó redukáló erő elektron transzport láncba történő átvitelét. A prekursor és a végtermék közötti körforgás hozzájárulhat a redukáló erő setjrészecskék közötti mozgásához, szállíthatja az elektronokat a NADPH-től a NADP^+ -re, összekapcsolhatja a NADPH oxidálását a mitokondriális elektrontranszporttal (Phang 1985). Tehát lehetséges, hogy a prolin abszolút mennyiségénél fontosabb a bioszintézis és lebontás körforgása a környezeti stresszhatásokhoz való

adaptálódásban, mivel ez hozzájárul a NADP^+ szint fenntartásához. A prolin szintézis általi NADP^+ -raktár feltöltés előnye a redox "körforgás" elősegítése lehet. Babiychuk és mtsai (1995) szerint ez fontos a növények antioxidatív védelmi mechanizmusában, melyben fontos szerepet játszik az oxidatív pentóz-foszfát ciklus. Ez összhangban van azzal, hogy NADPH -ra van szükség a glutation (GSH) és az aszkorbát redukált állapotának fenntartásához (Juhnke és mtsai, 1996). Számos bizonyíték utal a prolin szintézis fontosságára a pentóz-foszfát ciklus aktivitásának elősegítésében (Hare és Cress, 1997). Iyer és Caplan (1998) szerint a P5C (a prolin szintézis és lebontás egyik intermediere) megnövelte három ozmotikusan szabályozott gén expresszióját rizsben. P5C-vel vagy 3,4-dihidro-prolinnal kezelt növények kevesebb O_2 -t használtak fel, NADPH -szintjük csökkent, NADH -szintjük emelkedett és olyan ozmolitokat halmoztak fel, mint az ozmotikusan stressz során. Megállapításaik összhangban vannak Hare és Cress (1997) feltevéseivel. E szerint a prolin szintézis és lebontás folyamatából származó jel (valószínűleg a piridin nukleotid pool redox potenciálja) szabályozhatja az ozmotikus stresszre adott génexpressziós szintű válaszokat.

A többi ozmolithoz hasonlóan a stresszhatás megszűnését követően a prolin lebontása is szén-, nitrogén- és energiaforrásul szolgálhat a növekedés helyreállításához.

2.2.6. Prolin szerepének megismerése génmódosított növények felhasználásával

Az ozmotikus stressz során történő prolinfelhalmozódás szerepe már régóta foglalkoztatja a kutatókat. Több olyan közlemény látott napvilágot, amelyben a kutatók a prolin bioszintézisében, illetve lebontásban szerepet játszó enzimek kódoló génjeit felhasználva próbálták a növények stressztoleranciáját fokozni.

Kavi Kishor és mtsai (1995) beszámoltak a *Vigna aconitifolia*-ból származó P5CS-t túltermelő dohányok magasabb prolinszintjéről. Továbbá ezen génmódosított dohánynövények szárazság során nagyobb tömegű gyökeret és több virágot képeztek, mint a vad típusú növények. Ezek alapján úgy tűnik, a prolin bioszintézis kulcsenzimét kódoló gén túltermeltetésével javítani lehet a növények ozmotikus stresszel szembeni ellenállóképességét.

Zhu és mtsai (1998) szerint egy ABA- és stressz-indukálható promóter mögé épített *Vigna P5CS* cDNS rizsben történő kifejeztetése hozzájárult a növények emelkedett prolin

szintjéhez. Valamint ezen növények nagyobb tömegű biomasszát képeztek stressz körülmények között.

A fentebb említett P5CS-túltermelő transzgénikus dohány és rizs növények szárazság, illetve sóstressz esetén rezisztensebbnek tűntek, mint a vad típusú növények. Azonban nincs elég bizonyíték arra, hogy a prolin az ozmotikus kiigazításon vagy más mechanizmuson keresztül járul hozzá ezen növények stressztűréséhez (Sharp és mtsai, 1996).

Nanjo és mtsai szerint (1999a) a prolin nemcsak kompatibilis ozmolitként hat, hanem a növények növekedésében és morfogenezisében is szerepet játszik. Olyan génmódosított *Arabidopsis* csíranövényeket állítottak elő, melyek a P5CS cDNS-t antiszensz orientációban hordozták. A transzgénikus növények prolinszintje alacsonyabb volt a vad típusú növényekhez képest. Ezen növények stressztűrése is kisebb mértékű, ez a tulajdonság a táptalajhoz adott L-prolinnal gátolható volt. Ezen antiszensz növények rozettaleveleinek és virágzatának morfológiája is megváltozott. A külsőleg alkalmazott L-prolin ezen morfológiai változásokat is gátolta. Ez arra utal, hogy az L-prolin szerepet játszik a növények morfogenezisében is. A transzgénikus növények csökkent ozmotoleranciájáért pedig valószínűleg a növények megváltozott edénnyaláb rendszere a felelős. Nanjo és mtsai (1999a) szerint az antiszensz növényekben a sejtfal mátrix fehérjéinek bioszintézise is károsodott. Valószínűleg a sejtfal struktúrális fehérjéi közül az ún. PRP-k (Pro-rich proteins, azaz prolinban gazdag fehérjék) és HRGP-k (Hyp-rich glycoproteins, azaz hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek) felelősek a mutáns fenotípusért.

Mivel a bioszintézisen kívül a lebontás is befolyásolja a szabad prolin szintjét a növényekben, ezért feltehetően a lebontási folyamat gátlásával emelhető a prolin szint. Nanjo és mtsai (1999b) antiszensz *AtPDH* cDNS-t expresszáló *Arabidopsis* növényeket állítottak elő. Ezen transzgénikus növények a vad típusúhoz képest több prolint halmiztak fel, valamint megnövekedett ozmotoleranciát mutattak.

Mani és mtsai (2002) szintén a prolin dehidrogenáz szintjének változásából eredő hatásokat vizsgálták. Olyan génmódosított *Arabidopsis* növényeket hoztak létre, melyek a PDH gént szensz (továbbiakban PDH-S), illetve antiszensz (továbbiakban PDH-AS) orientációban tartalmazták. Közleményükben arról számoltak be, hogy a PDH-S növényekben a stressz alatt és a stresszhatás megszűnését követő helyreállítás során csökkent a prolin szintje, míg a PDH-AS növényekben pedig valamelyest emelkedett prolin szintet lehetett mérni. A prolin szintjében viszonylag csekély különbségek mérhetőek, annak ellenére, hogy a PDH mRNS- és fehérjeszintje jelentősen megváltozott. Stresszkörülmények között a PDH

transzgénikus növények ozmotoleranciája nem változott. Azonban a táptalajhoz külsőleg adott prolin megnövelte a PDH-S növények túlélését NaCl okozta stressz alatt. A PDH-AS növények viszont túlérzékenyek voltak az exogén prolinra, míg a PDH-S növények pedig a prolin analóg vegyületére voltak érzékenyebbek.

2.3. Jelátviteli folyamatok az ozmotikus stressz során

Az élőlények adaptív mechanizmusainak fő tulajdonsága, hogy külső hatásra indukálódnak, így az élő szervezetek erőforrásaikat csak szükség esetén mozgósítják. A növények számos mechanizmust fejlesztettek ki, amelyekkel a környezeti stresszhatásokat érzékelik, a jelzéseket közvetítik és összehangolják, így rájuk a megfelelő módon reagálnak. A különböző környezeti hatások többféle jelátviteli úton keresztül szabályozzák a génkifejeződést. Egy általános jelátviteli út a jel érzékelésével kezdődik, melyet a másodlagos hírvivők (pl. inozitol foszfátok, Ca^{2+}) képződése követ. A másodlagos hírvivők fehérje foszforilációs kaszkádot indíthatnak el, melyek végül a sejtek védekező reakcióiban közvetlenül szerepet játszó fehérjéket, illetve stressz-szabályozott géneket befolyásoló transzkripciós faktorokat érintenek. Ezen gének termékei részt vehetnek a szabályozó molekulák képződésében (pl. az ABA, etilén és a jázmonsav). Ezen szabályozó molekulák elindíthatják a jelátviteli út második körét, melyben gyakran más molekulák szerepelnek, mint az első körben. Egy elsődleges stressz aktiválhat több, térben és időben különböző jelátviteli utat. Ezen utak kapcsolódhatnak és kölcsönhatásba léphetnek egymással, létrehozva ezzel egy jelátviteli hálózatot.

2.3.1. Abiotikus stressz szignálok érzékelése

Az abiotikus stressz szignálok összetettségéből adódóan számos érzékelő meglétét feltételezik. Baktériumokban és élesztőben ún. kétkomponensű rendszerek vesznek részt az ozmotikus stressz érzékelésében. Mivel az *Arabidopsis*-ban található egyik hisztidin kináz, az AtHK1-t kódoló gén mRNS-szinten ozmotikus stressz által aktiválható, és a gén élesztőben történő kifejeztetése képes komplementálni az élesztő *sln1-ts* mutációját (a mutáns élesztőben sérült az egyik ozmoszenzor), ezért erről feltételezik, hogy ozmoszenzorként működik (Urao és mtsai, 1999). Az AtHK1 fehérjének két transzmembrán doménje, egy hisztidin kináz

doménje és egy, a válasz regulátorokhoz hasonló doménje van. Az *AtHK1* mRNS gyökerben mutatható ki a legnagyobb mennyiségben, levelekben az mRNS szintje emelkedik 250 mM NaCl-, hidegkezelés, valamint desztillált víz hatására is. A gént *sln1Δsho1Δ* élesztő kettős mutánsban (mindkét ozmoszenzor hiányzik) kifejeztetve nagymértékű ozmotoleranciát mutat a transzformált élesztő, jelezve, hogy az AtHK1 képes a HOG1 MAP kináz kaszkádot aktiválni (Urao és mtsai, 1999). Az *Arabidopsis* genomban számos további feltételezett kétkomponensű hisztidin kinázt kódoló gént azonosítottak (Urao és mtsai, 2000), bár még ezek géntermékeinek funkciója nem ismert.

A mitogén aktivált protein kináz (MAP kináz) jelátviteli kaszkádok széleskörűen előfordulnak az eukarióta élőlényekben, melyek az extracelluláris térből érkező információt a citoszolba és a sejtmagba továbbítják. Ezen jelátviteli folyamatok előfordulnak a sejtosztódás, a sejtek differenciálódása, a metabolizmus, valamint a biotikus és abiotikus stresszhatásokra adott válaszokban. Növényekben a MAP kinázokat, illetve a jelátviteli láncban előttük elhelyezkedő szabályozó komponenseket kódoló gének multigén családokat alkotnak. Ezen gének termékei különböző jelátviteli utakat alkotnak, melyek összetett hálózatot képeznek. A növényekben számos, ozmotikus stressz által aktivált MAPK is található. Lucerna sejtekben egy 46-kDa tömegű MAPK, a SIMK (Salt Stressz-Inducible MAP Kinase, sóstressz-indukálható MAP kináz) aktiválódik hiperozmotikus stressz során (Munnik és mtsai, 1999). Dohány sejtekben egy hasonló MAPK, a SIPK (Salicylic acid-Induced Protein Kinase, szalicilsav-indukált protein kináz) található (Mikolajczyk és mtsai, 2000). *Arabidopsis*-ban található egy fehérje, amely keresztreakciót mutat a dohány SIPK ellenanyaggal és ozmotikus stressz hatására ez is indukálódik (Hoyos és mtsai, 2000). *Arabidopsis*-ban legalább 3 MAPK-t találtak, melyeket NaCl, hideg, mechanikai sérülés aktivál (Ichimura és mtsai, 2000). Tehát növényekben is megtalálhatóak a MAP kináz kaszkádok, de ezek szerepének pontosabb feltérképezéséhez további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

Növényi sejtekben a kalcium másodlagos hírvivőként szolgál az abiotikus stressz jelátviteli folyamatokban. A citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációjában bekövetkező emelkedést számos környezeti hatás kiválthatja (pl. vörös fény, ABA, gibberrellin, ozmotikus stressz, oxidatív stressz, NOD faktorok, érintés, gomba elicitorok: Sanders és mtsai, 1999), ezért a Ca^{2+} a különböző jelátviteli utak találkozási pontjaként szerepelhet. A kialakuló Ca^{2+} -szint emelkedés hatására létrejövő válaszokat feltehetőleg befolyásolja az emelkedés kinetikája, mértéke és a Ca^{2+} sejten belüli forrása (Knight és Knight, 2001). Az abiotikus stressz jelátvitelében a kalmodulin, Ca^{2+} -függő protein kinázok (Ca²⁺-Dependent Protein Kinase:

CDPK), a SOS3 (Salt Overly Sensitive3, sóra túlérzékeny) családba tartozó Ca^{2+} -érzékelők és a Ca^{2+} -függő foszfatázok kapcsolják össze a Ca^{2+} -t, mint általánosan előforduló inorganikus jelet a fehérje foszforilációs kaszkádokkal.

A kalmodulin az eukarióta élőlényekben található egyik legkonzerváltabb, kisméretű fehérje. Állati és növényi sejtekben is a kalmodulin az elsődleges Ca^{2+} -receptor. A molekula 4 Ca^{2+} -kötő ún. EF-hand motívummal rendelkezik. A különböző növényi sejtekben található kalmodulin mennyisége nagymértékben eltérő és a fejlődési stádiumtól is függ. Pl. a gyökér sztatocitáiban kb. 10-szer több kalmodulin található, mint a merisztematikus sejtekben (Trewavas, 2000). A Ca^{2+} kötődése a kalmodulin konformációjának megváltozását okozza. A konformációváltozás következtében hidrofób aminosavak kerülnek egymás közelébe a molekula felszínén. Ezen hidrofób "foltokat" felismerik a kalmodulin-kötő fehérjék, melyek a kalmodulinhoz való kötődést követően aktiválódnak (Luan és mtsai, 2002). A kalmodulin fontos szerepet játszik a hiperszenzitív reakcióban és a mechanikai sérülés jelátviteli folyamatában (Yamakawa és mtsai, 2001). Egyes kalmodulint kódoló gének sóstresszel indukálhatóak, illetve fejlődési stádium-specifikus génkifejeződést mutatnak (Luan és mtsai, 2002, valamint az ebben szereplő hivatkozások). A kalmodulinoknak fontos szerepe van a polarizált növekedésben, sejtosztódásban, citoplazma áramlásban és számos egyéb folyamatban (Trewavas, 2000).

A CDPK-k Ser / Thr kinázok, melyek C-terminális részén kalmodulin-szerű domén és EF-hand motívum található, amely képes közvetlenül Ca^{2+} -t kötni. Némely CDPK N-terminális részén mirisztációs motívum található, mely a membránhoz való kötődés lehetőségére utal. Az *Arabidopsis* genom legalább 34 feltételezett CDPK-t kódoló gént tartalmaz (Harmon és mtsai, 2001). Számos közlemény arról számol be, hogy a CDPK-k indukálhatók vagy aktiválhatók abiotikus stresszhatások által, jelezve ezen fehérjék feltételezhető szerepét a jelátvitelben (Hwang és mtsai, 2000).

A növényekben található Ca^{2+} -érzékelők fontos csoportját jelenti a SOS3 család. A SOS3 aminosav szekvenciája hasonló az élesztő kalcineurin fehérje szabályozó alegységéhez (CNB: a kalcineurin egy Ca^{2+} -kalmodulin-függő foszfatáz, melynek fontos szerepe van különböző környezeti faktorokra adott válaszokban) és az állati idegsejtek Ca^{2+} -érzékelőjéhez (Liu és Zhu, 1998). A SOS3 fehérje 3 Ca^{2+} -kötő EF hand motívumot tartalmaz. A funkcióvesztéses *Arabidopsis* *sos3* mutáns túlérzékeny NaCl-ra. A SOS3 fehérje működéséhez elengedhetetlenül szükséges a mirisztáció, ami arra utal, hogy ez a fehérje membrán-kötött ion transzportereket szabályoz (Ishitani és mtsai, 2000).

A Ca^{2+} -függő foszfatázoknak is jelentős szerepük van a jelátviteli folyamatokban. A 2C típusú foszfatázok közé tartozó ABI1 és ABI2 (Absciscic acid Insensitive 1, 2) fehérjéről részletesen az abszcizinsavról szóló fejezetben lesz szó.

Állati és növényi sejtekben a foszfolipid jelátvitel fontos szerepet tölt be a különböző jelátviteli kaszkádokban. A foszfolipáz A_2 , C és D előfordulása bizonyított növényi sejtekben. A foszfolipidek foszfolipáz A_2 által katalizált hidrolízise során szabad zsírsav és lizofoszfolipid keletkezik. Ezen molekulák a növényi sejtekben található plazmamembrán H^+ -ATPáz aktivitását fokozzák (Trewavas, 2000). A növényekben olyan foszfolipáz A_2 is található, mely részt vesz a patogén fertőzés során létrejövő oxidatív robbanás ("oxidative burst") kialakulásában. A foszfolipáz A_2 által katalizált reakcióban linolénsav is keletkezhet, mely az oktadekanoid bioszintézis úton keresztül jázmonsavvá alakulhat (Trewavas, 2000), mely részt vesz a génexpresszió szabályozásában. Frank és mtsai (2000) két foszfolipáz D-t kódoló cDNS-t izoláltak *C. plantagineum*-ból. Mindkét foszfolipáz D rendelkezik Ca^{2+} -kötő doménnel, tehát ezen a ponton kapcsolódhatnak a foszfolipid jelátviteli folyamatok a Ca^{2+} -jelátviteli folyamatokhoz. Növényekben a PLC a foszfatidilinozitol 4,5 bifoszfátot (PIP_2) hidrolizálja, így két fontos molekula, a diacilglicerol (DAG) és az inozitol 1,4,5 trifoszfát (IP_3) szintje emelkedik. A DAG és az IP_3 olyan másodlagos hírvivők, amelyek aktiválják a protein kináz C-t és elősegítik a Ca^{2+} -felszabadulást. Növényekben megemelkedik az IP_3 szintje fény, patogének, oxigénhiány és számos hormon hatására. *Arabidopsis*-ban az IP_3 szintje sóstressz során megemelkedett és ez időben egybeesett a citoszol Ca^{2+} -szintjének változásával. A PI-PLC enzim gátlásával megakadályozható ez az átmeneti Ca^{2+} -szint emelkedés (DeWald és mtsai, 2001) *Arabidopsis* csíranövényekben az ABA is kiváltja az átmeneti IP_3 -szint emelkedést (Sanchez és Chua, 2001).

2.3.2. Jelátviteli utak közötti kapcsolat

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 (Genoud és Métraux, 1999; Smeeckens, 2000; Chory és Wu, 2001). Számos cukor-inszenzitív mutáns ABA-rezisztensnek bizonyult, ami a cukor és ABA jelátviteli utak közötti kapcsolatra utal (Smeeckens, 2000; Arenas-Huertero, 2000).

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 (Németh és mtsai, 1998). 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. A PRL1 fehérje kölcsönhat a növényekben található SNF-szerű szerin/ treonin kinázokkal (Sucose Non-Fermenting Related Kinase: SnRK) és gátolja azok működését (Bhalerao és mtsai, 1999). A növényi SnRK-k és az élesztőben található SNF kinázok az ún. AMP-aktivált protein kinázok közé tartoznak, amelyek fontos szerepet játszanak az élesztő, illetve emlős sejtekben a glükóz- és stressz jelátvitel szabályozásában, valamint a szénhidrát anyagcsere enzimeit kódoló gének működésének befolyásolásában (Hardie és mtsai, 1998). Az *Arabidopsis*-ban található SnRK-k a fehérje degradáció szabályozásában is részt vesznek, ugyanis kölcsönhatásba lépnek az SCF komplex bizonyos elemeivel (Farrás és mtsai, 2001). Az SnRK-k közé tartozó egyik fehérje (melyet *Arabidopsis*-ban a *SOS2* gén kódol) a NaCl tolerancia kialakításában vesz részt.

Hellmann és mtsai (2000) beszámoltak egy cukor jelátvitelben sérült mutánsról, mely prolin túlérzékenynek bizonyult, tehát az ozmotikus stressz válaszok és a cukor jelátviteli folyamatok között is létezik kapcsolat. Ismert a fény prolin felhalmozódásra gyakorolt pozitív hatása (Goas és mtsai, 1982; Joyce és mtsai, 1984). A fény-sötét ciklusnak megfelelő *AtP5CS1* mRNS-, illetve prolinszint oszcillálás felveti a fitokróm-jelátviteli folyamatokkal való kapcsolat lehetőségét (Hayashi és mtsai, 2000; Chory és Wu, 2001). A *det2* és *cpd1* BR-t nem tartalmazó *Arabidopsis* mutánsokban számos fény által szabályozott gén transzkripcionális szinten derepresszált (Szekeres és mtsai, 1996; Li és mtsai, 1996). Ez arra utal, hogy a növényi szteroid hormonok is befolyásolják a környezeti stresszhatásokra adott válaszokat (Dhaubhadel és mtsai, 2002). Ezt támasztja alá, hogy a cukor- és ABA-túlérzékeny *prl1 Arabidopsis* mutánsban számos fény-indukált, illetve cukor-represszált gén transzkripcionálisan derepresszált, míg a brasszinoszteroid bioszintézishez szükséges *CPDI* gén expressziója pedig csökkent mértékű (Németh és mtsai, 1998; Salchert és mtsai, 1998).

2.4. Hormonok szerepe az ozmotikus stressz során

2.4.1. Abszcizinsav

A környezeti hatásokra a növények részben a génexpressziós mintázatuk megváltoztatásával válaszolnak, mely végső soron sejt-, illetve növény szintű adaptív válaszokhoz vezet (Hasegawa és mtsai, 2000). 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: Koorneef és mtsai, 1998). 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. Annak eldöntését, vajon az összes ozmotikus stresszválaszban szerepel-e az ABA, nagymértékben megkönnyítették az ABA-t nem tartalmazó, illetve az ABA-érzékeny mutánsok. *Arabidopsis*-ban az *aba1*, *aba2*, illetve az *abi1*, *abi2* mutánsokat tanulmányozták részletesen ebből a szempontból (Koorneef és mtsai, 1998). Általános következtetésként azt lehetett ezekből a kísérletekből megállapítani, hogy a hideg által indukált gének expressziója viszonylag független az ABA-tól, míg az ozmotikus stressz által indukált gének ABA-függő és ABA-független utakon keresztül is aktiválódhatnak (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Az ABA jelátvitelének tanulmányozásában fontos szerepet kapott az *abi1* és *abi2* mutáns, mivel számos, ABA-val kiváltható élettani és génexpressziós szintű válasz is megváltozott a mutánsokban (pl. ABA-rezisztens csírázás, gázcsereenyíltások működésének zavara, hervadás: Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 1997; 2000). Az *ABI1* és *ABI2* gének egymással homológ 2C típusú szerin/ treonin foszfatázokat kódolnak (Leung és mtsai, 1994). Ez arra utal, hogy az ABA jelátvitelében a fehérje foszforilációnak/ defoszforilációnak szerepe van. Ezt támasztja alá, hogy *Arabidopsis* zárósejtekben egy általános protein kináz inhibitorral (K252a) részlegesen gátolni lehetett az *abi1* mutáció által okozott, az ABA-függő sztómazáródás elvesztésében megnyilvánuló fenotípust (Pei és mtsai, 1997). Az *ABI1* fehérje N-terminális doménje tartalmaz egy ún. EF-hand motívumot (mely a Ca^{2+} -kötésért felelős), mely az *ABI2* fehérjében nem található meg (Rodriguez és mtsai, 1998). Az *abi1* és *abi2* funkciójának meghatározását nehezítette az a tény, hogy ezek domináns mutánsok voltak

(Leung és mtsai, 1994; Leung és mtsai 1997; Rodriguez és mtsai, 1998). A később izolált recesszív *abi1* mutánsok viszont nem ABA-rezisztensek, hanem ABA-túlérzékenyek voltak, csakúgy, mint a recesszív *abi1abi2* dupla mutánsok. Továbbá az ABI1 és ABI2 foszfatázok aktivitása ABA hatására fokozódik (Merlot és mtsai, 2001). E mutánsok analízisének eredménye az a modell, mely szerint részben átfedő funkcióval, az ABI1 és ABI2 foszfatázok az ABA válasz negatív szabályozói, egy negatív visszacsatolási hurokban működve. Élesztőben csak 5 PP2C található, ezzel szemben az *Arabidopsis* genomban harmincnál is több PP2C-szerű gén van. A recesszív *abi1abi2* dupla mutánsokban azonban kimutatható ABA-val indukálható foszfatáz, tehát az ABI1 és ABI2 fehérjéken kívül más PP2C foszfatáz(ok) is részt vesz az ABA-indukált jelátvitelben (Merlot és mtsai, 2001).

Az ABI3, ABI4 és ABI5 fehérjék a transzkripciós faktorok közé tartoznak. Az *ABI3* szekvencia homológiát mutat a kukorica (*Zea mays*) VP1 transzkripciós faktorial. Az *abi3* funkcióvesztéses mutánsok más fenotipikus jegyeket is mutattak mint az ABA-auxotróf mutánsok (Nambara és mtsai, 1995). Pl. ezen mutánsokban sérült a mag érése és nem halmoznak fel bizonyos tartalék tápanyagokat. Az embrióban megfigyelhető, az ABA-tól független fenotípusokért ezen *abi3* mutánsok csökkent auxin-érzékenysége lehet felelős (Brady és mtsai, 2003). A vad típusú *Arabidopsis* magokon külsőleg alkalmazott auxin-kezelés megnöveli az ABA-érzékenységet (csírázási ráta alapján mérve). Ez arra utal, hogy az auxin szintézisben, illetve érzékenységben bekövetkező változás befolyásolhatja a magok ABA-érzékenységét. Az *ERAI* gén (Enhanced Response to ABA, ABA-ra erősebben reagáló: ezen gén terméke egy farnezil transferáz, és a gén mutációja a magok ABA-túlérzékenységét okozza) negatív szabályozója az *ABI3* transzkripciónak. Így az *eral* funkcióvesztéses mutánsok ABA-túlérzékenysége azzal magyarázható, hogy ezen mutánsokban nagyobb mennyiségű ABI3 található, mely az auxin hatás erősítése révén okozza a túlérzékenységet (Brady és mtsai, 2003).

Az intenzív kutatások ellenére sokáig csak olyan ABA-mutánsokat találtak, melyek a PP2C típusú foszfatázok (*abi1*, *abi2*: Leung és mtsai, 1997), illetve a transzkripciós faktorok (*abi3*, *abi4*, *abi5*: Finkelstein és Lynch, 2000) közé tartoztak. Yoshida és mtsai (2002) számoltak be az *Arabidopsis srk2e* mutánsról, mely a levegő páratartalmának csökkenésére rövid időn belül hervadásos fenotípussal válaszolt. A mutáció az *SRK2E* gént érinti, mely egy SnRK2 (SNF-Related Protein Kinase 2: SNF-szerű protein kináz 2) típusú kinázt kódol, melynek fontos szerepe van a vízstresszre adott ABA-jelátvitelben.

2.4.2. Brasszinoszteroidok szerepe

A szövetek és szervek szintjén növényi hormonok szabályozzák a növények környezeti hatásokra adott válaszait. A hormonok szintjében bekövetkező változások befolyásolják a sejtosztódást, megnyúlást és differenciálódást. Az 1970-es években jelentek meg az első közlemények, melyek egy új típusú növényi növekedést befolyásoló faktor felfedezéséről számoltak be. A brasszinoszteroidoknak elnevezett vegyületcsoportnak ma már több, mint 40 tagja ismert. A brasszinoszteroidok serkentik a sejtosztódást, a szár megnyúlását, a levelek kiterülését, a xilém differenciálódását, az etilén bioszintézisét és gátolják a gyökérnövekedést (összefoglaló: Clouse és Sasse, 1998). Bizonyított, hogy a brasszinoszteroidok szinergisztikusan hatnak az auxinokkal a növekedés elősegítésében, additív hatás figyelhető meg a citokininekkel a sejtosztódás befolyásolásában és a levelek szenescenciájára gyakorolt hatásuk ellentétes az ABA-éval (Mandava és mtsai, 1988). Szabadföldi kísérletekben növelte a termékenységet és javította a növények stressztűrő képességét (Mandava és mtsai, 1988). 24-epibrassinoliddal kezelt repce (*Brassica napus*) csíranövények hőtűrő képessége megnőtt a kezeletlen növényekhez képest és a hősokk fehérjék négy alaptípusának mennyisége is emelkedett volt. Számos transzlációs iniciációs és elongációs faktor is szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen a BR-kezelt növényekben (Dhaubhadel és mtsai, 2002). Ezen eredmények arra utalnak, hogy az epibrassinolid-kezelés csökkenti a transzlációs apparátus alkotóelemeinek elvesztését a tartós hőstressz során és a stressz utáni helyreállítás során megnöveli a sérült komponensek kifejeződését, ami a hőstresszt követően hozzájárul a fehérjeszintézis gyorsabb helyreállításához.

A BR-t nem tartalmazó mutánsok fenotípusa lényegesen eltér a vad típustól. Ezen mutánsok törpe növekedésűek, robusztus felépítésűek, sötétzöld színűek. Általában csökkent termőképességűek és hosszabb életciklusúak. Sötétben növesztve ezen mutánsok abnormális szkotomorfogenezist mutatnak, azaz rövid a hipokotiljük, szikleveleik nyitottak, elsődleges levelek jelennek meg és számos fény-szabályozott gén expressziója is emelkedett (Li és Chory, 1999). Az egyik legrészletesebben jellemzett BR-hiányos *Arabidopsis* mutáns a *det2* (deetiolated 2: de-etiolált 2; Li és mtsai, 1996). A *DET2* gén által kódolt fehérje hasonlóságot mutat az emlősökben található szteroid-5 α -reduktázokhoz. A feltételezést, mely szerint ez a fehérje a növényi szteroid szintézis 5 α -redukciós lépését katalizálja alátámasztja, hogy emlős

sejtekben kifejezve képes egyes szteroidok redukálására, illetve az emlős 5α -reduktázok a *det2* mutánsban kifejeztetve komplementálni tudták a mutáns fenotípust (Li és mtsai, 1997).

3. 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* gének klónozása *Arabidopsis thaliana*-ból

AtP5CS gének szekvencia analízise

AtP5CS gének expressziós analízise:

Szövetspecifitás

Stressz-indukció

Hormon-szabályozás

„crosstalk” más környezeti faktorokkal

promóter analízis

4. Anyagok és módszerek

4.1 *Arabidopsis* ökotípusok és mutánsok

Arabidopsis thaliana ökotípusok:

Columbia-1

Landsberg erecta

Arabidopsis mutánsok:

aba1-1 (Koorneef és mtsai, 1982)

abi1-1 (Koorneef és mtsai, 1984)

abi2-1 (Koorneef és mtsai, 1984)

abi3-1 (Koorneef és mtsai, 1984)

aux1-7 (Pickett és mtsai, 1990)

axr2 (Wilson és mtsai, 1990)

det2 (Li és mtsai, 1996)

prl1 (Németh és mtsai, 1998)

4.2. Az *Arabidopsis* nevelési körülményei

A magokat 5 % kalcium-hipoklorit oldatban 15 percig sterilizáltuk, majd steril desztillált vízzel történő ötszöri átmosást követően növénytenyésztő üvegekben levő ½ MSAR táptalajra helyeztük (szükség szerint a szelekcióhoz 50 mg/l kanamicint, illetve 15 mg/l higromicint alkalmaztunk). A növényeket 2-4 hétig neveltük 22 °C-on 16 h fény, 8 h sötét ciklus mellett.

Gyökérkultúra előállítása:

Gyökérkultúra előállításához egyhetes Col-1 csíranövényeket 250 ml-s Erlenmeyer lombikban 3 hétig neveltünk 50 ml ½ MSAR tápoldatban, 50 rpm rázatás mellett.

Kalluszkultúra előállítása:

Vad típusú (Col-1) gyökerekből indított kalluszkultúrát 2.0 mg/ml IAA-t (indol-3-ecetsav), 0.5 mg/l 2,4-D-t, 0.2 mg/l kinetin-t (6-furfuril aminopurin) és 0.2 mg/l IPAR-t (N⁶-

(2-izopentenil)-adenozin) tartalmazó szilárd ún. MSAR1 táptalajon tartottuk fenn (Koncz és mtsai, 1994).

Sejtszuspenziós kultúra előállítása:

Vad típusú (Col-1) gyökerekből indított sejtszuspenziós kultúrát 1 mg/l 2,4-D-vel kiegészített MSAR tápoldatban tartottuk fenn és hetente átolítottuk friss tápoldatba (Mathur és mtsai, 1995).

4.3. Növények kezelése

Prolin felhalmozódás vizsgálatokor a következő 24 h-s kezeléseket alkalmaztuk:

- 200 mM NaCl
- 200 mM mannitol
- 200 mM glükóz
- 4 °C
- 10 µM ABA
- 1 mg/l IPAR
- 1 mg/l 2,4-D.

Sötétadaptáció hatásának vizsgálata:

A sötétkezelés hatásának vizsgálatokor 3 hétig fényen nőtt növényeket a növénytenyésztő üvegek alufóliába történő becsomagolásával sötétadaptációnak vetettünk alá, melynek hossza 3 nap volt (ha másként nem jeleztük). A stresszkezeléseket is sötétben végeztük, majd mintát vettünk prolin meghatározáshoz, illetve Northern hibridizációhoz.

Kiszáritás hatásának vizsgálata

A kiszáritás hatásának vizsgálatához 4 hetes, *in vitro* nevelt növényeket használtunk. A mintavételt megelőzően 6, illetve 24 órára eltávolítottuk a növénytenyésztő üvegek fedelét, majd mintát vettünk Northern hibridizációhoz.

Cikloheximid hatásának vizsgálata:

A fehérjeszintézis-gátlás *AtP5CS* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatokor vad típusú *Arabidopsis* (Col-1) csíranövényeket 0.2 mM cikloheximiddel kezeltünk egy órán

át, majd az 1, illetve a 6 h-n át tartó 200 mM NaCl-kezelést követően mintát vettünk Northern hibridizációhoz.

NaCl-kezelés hatásának vizsgálata

A 200 mM NaCl-kezelést ált. 1, 6, illetve 24 h-n keresztül alkalmaztuk (ha másként nem jeleztük).

A különböző koncentrációjú NaCl-dal kiegészített 1/2MSAR táptalajon való 8 napig tartó csíráztatás *AtP5CS1* gén mRNS szintjére gyakorolt hatásának vizsgálatokor 25, 50, 100, 150 és 200 mM NaCl-ot alkalmaztunk.

Az ABA-szintézist, illetve a hormon-érzékenységet érintő mutációk *AtP5CS* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatokor a vad típusú (Col-1), *aba1-1*, *abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1*, *aux1-7*, *axr2* növényeket 1, illetve 6 h-n át 200 mM NaCl-kezelésnek vetettünk alá.

Hormonok hatásának vizsgálata

Génexpressziós szintű vizsgálatainknál a következő hormonokat használtuk:

10 μ M ABA; 24 h-n át (ha másként nem jeleztük)

1 mg/l 2,4-D; 6 h és 24 h-n át

1 mg/l BAP; 6 h és 24 h (ha másként nem jeleztük)

0.1 μ M 24-epibrassinolid (a stresszkezeléseket megelőzően 3napon át, illetve a kezelések ideje alatt is)

4.4. *Arabidopsis* vákuum infiltrációs transzformálása

Az elkészített vektorkonstrukciók *Arabidopsis*-ba történő bejuttatásához a vákuum infiltráció módszerét használtuk (Bechtold és mtsai, 1993). Az üvegházban 8 cm átmérőjű műanyag cserépbe vetettünk vad típusú (Col-1) magokat. Az elsődleges virágokat eltávolítottuk, hogy nagyszámú másodlagos virágot transzformálhassunk. A transzformáció során a növényeket infiltrációs tápoldatban (5% szacharóz, 0.01% Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) felszuszpendált ($OD_{600nm}=1.5$) *Agrobacterium*-szuszpenzióba merítettük vákuum alatt. Addig alkalmaztuk a vákuumot, amíg a növényi szövetekből levegőbuborékok távoztak (6-7 perc). A nyomás kiegyenlítését követően a növényeket

éjszakára kenyérfóliával letakartuk, majd visszavittük az üvegházba. A transzformálást 5-6 nap múlva megismételtük. Az összegyűjtött magokat felszín-sterilizáltuk, majd szelektív táptalajon kicsíráztattuk.

4.5. Molekuláris biológiai alapszerek

Plazmid DNS-ek restrikciós endonukleázzal történő hasításait mindig a gyártó szerint az adott enzim számára meghatározott optimális körülmények között végeztük. A DNS-ek gélelektroforézisét, a DNS fragmentek agarózgélből való elektroelúciós izolálását, alkalikus foszfatáz-kezelést, ligálást, *Escherichia coli* tenyészetekből kis és nagy mennyiségű plazmid DNS izolálást Sambrook és mtsai (1989) által leírtak szerint végeztük.

4.6. Southern hibridizáció

A Southern hibridizációs analízishez Columbia és Landsberg erecta ökotípusba tartozó *Arabidopsis* csíranövényekből genomi DNS-t izoláltunk (Dellaporta és mtsai, 1983). Az izolált DNS-t KpnI, EcoRI és XbaI restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, gélelektroforézissel méret szerint elválasztottuk és Hybond N nylon filterre transzferáltuk (Sambrook és mtsai, 1989). A hibridizációt 65 °C végeztük az *AtP5CS1*, illetve az *AtP5CS2* cDNS-t használva próbaként (Sambrook és mtsai, 1989). CIC és yUP YAC (Yeast Artificial Chromosome: azaz élesztő mesterséges kromoszóma) könyvtárakat (Creusot és mtsai, 1995; Ecker és mtsai, 1990) szűrtünk *AtP5CS* gén-specifikus próbákkal. A térképezési adatok igazolásához a YAC klónokból izolált DNS-t is felhasználtuk Southern hibridizációhoz (Matallana és mtsai, 1992).

4.7. Vektorkonstrukciók létrehozása

Az *AtP5CS1* gén promóter régióját (GenBank azonosító: 6598383; 45500 és 48720 nukleotidok közötti rész) és az *AtP5CS2* gén promóter régióját (GenBank azonosító: 7263547; 17110 és 19150 nukleotidok közötti rész) PCR reakció segítségével felszaporítottuk, pBluescript SK(+) vektorba klónoztuk és szekvenáltattuk. Egy 3kb

hosszúságú EcoRI-XbaI fragmentet (amely a *P5CS1* promotert tartalmazta), illetve egy 2kb hosszúságú KpnI-HincII fragmentet (amely a *P5CS2* promotert tartalmazta) klónoztuk a pPR97 bináris vektorba, a promoter-nélküli *uidA* (*GUS*) riporter gén elé (Szabados és mtsai, 1995). A létrehozott vektorkonstrukciók *Arabidopsis*-ba való juttatásához a vákuum infiltrálás módszerét használtuk (Bechtold és mtsai, 1993). Az elsődleges transzformáns növényeket (T_1) 50 mg/l kanamicint tartalmazó $\frac{1}{2}$ MSAR táptalajon szelektáltuk, majd az önbeporzást követően magot gyűjtöttünk. A T_2 generációban azonosítottunk olyan vonalakat, melyekben egyetlen T-DNS inszerció volt homozigóta formában. Ezen vonalakat használtuk fel a promoterek jellemzéséhez, illetve a *prl1* (Németh és mtsai, 1998) *Arabidopsis* mutánssal való keresztezéshez. A kanamicin-rezisztens F_1 vonalak szelekcióját és önbeporzását követően az F_2 generációban olyan vonalakat kerestünk, amelyek homozigóták a *prl1* mutációra (higromicin szelekciós markerrel megjelölt a gén).

4.8. GUS enzimaktivitás meghatározása

GUS enzimaktivitás mennyiségi meghatározása fluorimetriával

A β -glükuronidáz enzim aktivitásának méréséhez Jefferson és mtsai (1987) módszerét használtuk. A kísérleteket háromszor ismételtük és legalább három párhuzamos mintát mértünk minden kísérletben. A begyűjtött növényi anyagot felhasználásig -80°C -on tároltuk. A növényi anyagot GUS extrakciós pufferben kvarchomok segítségével feltártuk. A mintákat 4°C -on centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc) és a fehérjekivonatokat is ezen hőmérsékleten tároltuk. A GUS enzimaktivitás mennyiségi meghatározásához fluorimetriás módszert használtunk. A méréseket TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments) fluoriméter felhasználásával végeztük.

A felhasznált oldatok:

karbonát stop puffer: 0.2 M Na_2CO_3

MU kalibráló standard: 50 nM MU (karbonát stop pufferben feloldva)

GUS extrakciós puffer: 50 mM Na-foszfát puffer (pH7.0), 10 mM β -merkaptóetanol,

10 mM Na_2EDTA , 0.1 % Triton X-100

GUS assay puffer: 2 mM MUG GUS extrakciós pufferben feloldva

A reakciót 50 µl végtérfogatban végeztük, melyből 40 µl volt a GUS assay puffer, a maradék 10 µl pedig GUS extrakciós puffer volt, mely 1 µg fehérjét tartalmazott. A reakciót 37 °C-n végeztük, és 30 percenként mintát vettünk a fluorimetriás meghatározáshoz.

GUS hisztokémiai analízis

A vizsgálni kívánt növényeket 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-glükuronid, GUS extrakciós pufferben)-oldatban festettük 37 °C-on 6 h-n keresztül. A szubsztrát növénybe jutásának elősegítésére 5' vákuumot alkalmaztunk. Az inkubáció befejezése után 70 %-os etanollal fixáltuk a mintákat, illetve távolítottuk el a pigmenteket.

4.9. Össz RNS izolálása növényekből

Az RNS izoláláshoz felhasznált összes oldatot 0.1 % dietil-pirokarbonáttal (DEP) kezeltük (Sambrook és mtsai, 1989). Az izolálás során a Pawlowski és mtsai (1994) által leírt módszert követtük kisebb módosításokkal. A növényi mintákat begyűjtés után lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és felhasználásig –70 °C-on tároltuk. A mintákat dörzsmozsárban porszerűvé dörzsöltük folyékony nitrogénben, majd szétosztottuk Eppendorf-csövekbe és azonnal hozzáadtunk 1 térfogat 90°C-ra felmelegített fenol-TELS (100 mM LiCl; 100 mM Tris-HCl pH8.0; 10 mM EDTA; 1 % SDS) 1:1 arányú keverékét. A 30 mp-ig tartó intenzív keverést követően 1 térfogat kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtuk a mintákhoz, 30 mp-ig kevertük a mintákat, majd 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-mel. A felülúszót Eppendorf-csövekbe osztottuk szét és 1 térfogat 4 M LiCl-ot adtuk a mintákhoz. Összekeverést követően 4 °C-on inkubáltuk a csöveket éjszakán át. 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk a mintákat (13000 rpm), majd eltávolítottuk a felülúszót. A csapadékot 400 µl steril vízben feloldottuk, majd fenol-kloroform és kloroform extrakciót követően 0.1 térfogat 3 M Na-acetát (pH5,2) és 2 térfogat –20 °C-os 96%-os etanol hozzáadásával kicsaptuk az RNS-t. 15 perc centrifugálást követően a felülúszót eltávolítva a csapadékokat –20 °C-os 70%-os etanollal mostuk, szárítottuk és 100-100 µl steril vízben oldottuk fel. Az így elkészült RNS mintákat –70 °C-on tároltuk.

4.10. Northern-analízis

RNS gélelektroforézis denaturáló körülmények között

Az RNS-koncentrációkat 260 nm-en végzett optikai denzitás-méréssel meghatároztuk (Sambrook és mtsai, 1989) és 5 µg/µl-re állítottuk be. Az elektroforézishez 4 µl RNS-mintát használtunk fel. A mintákhoz 10 µl formamidot, 2 µl 10xMOPS puffert (0.2 M 3-(N-morfolino) propán-szulfonsav, 0.5 M Na-acetát pH7.0, 0.01 M EDTA), 3.5 µl 37 % formaldehidet, 0.5 µl 0.5 mg/ml etídium-bromidot adtunk, az összekeverést követően 15 percig 65 °C-on inkubáltuk a mintákat. A jégen történő lehűtést követően a mintákat 6 % formaldehid és 1xMOPS puffer tartalmú 1,2 %-os agarózgélen méret szerint elválasztottuk. Az elektroforézis után a nukleinsavakat Hybond N⁺ nylonfilterre transzferáltuk kapilláris blottal, 20x SSC puffer (3 M NaCl, 300 mM Na-citrát, pH7.0) felhasználásával (Sambrook és mtsai, 1989). A filtereket 5 percig szárítottuk Whatman papír között, majd az RNS-ek kötődését UV keresztkötéssel irreverzibilissé tettük (UV Stratalinker felhasználásával). A filterekről fotót készítettünk, melyek információval szolgáltak az átblottolt RNS-ek mennyiségéről és minőségéről, illetve kontroll hibridizálást végeztünk ubiquitin10 cDNS felhasználásával (Sun és Callis, 1997).

Génspecifikus próbák előállítása Northern hibridizációhoz

Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének térképezése, szövetspecifikus génkifejeződésük, különböző környezeti és hormonális hatásokra adott mRNS szintű válaszreakcióinak tanulmányozása során a Northern hibridizációhoz a következő génspecifikus próbákat használtuk fel:

A PCR reakció során templátként a pBluescript II SK(+) vektorba klónozott *AtP5CS1*, illetve *AtP5CS2* cDNS szolgált. Felhasználtuk a vektor T7 promóter primerét (5'-TGTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'), valamint egy olyan primert, amely az *AtP5CS* cDNS-ek 3' nem-transzlálódó, egymáshoz kisebb homológiát mutató részéhez terveztünk (5'-GTTTACACCCATACAGGA-3').

A sötétadaptáció, illetve a 24-epibrassinolid előkezelés *AtP5CS1*, *AtP5CS2* és *PDH* génkifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálata során a következő próbákat használtuk fel:

PDH cDNS (Hellmann és mtsai, 2000)

Génspecifikus *AtP5CS1* próba: templátként a pBluescript II SK vektorba klónozott *AtP5CS1* cDNS szolgált, a P5C1A (5'-AAACAAGACTTCCGAGTGTGTG-3') és a P5C1B (5'-GGTAGCTTACAATGACAAGAAGAG-3') primerek felhasználásával állítottuk elő a próbát.

Génspecifikus *AtP5CS2* próba előállításához felhasználtuk a P5C2A (5'-GTCTTACAAAGGACAGAGGCTG-3') és a P5C2B (5'-AACATTTCACTATTATACAA GACCAC -3') primereket, templátként a pBluescript II SK vektorba klónozott *AtP5CS2* cDNS szolgált.

Northern hibridizáció

A hibridizáláshoz felhasznált DNS fragmenteket (α -³²P)dCTP-vel, a random priming módszer felhasználásával radioaktívan jelöltük (Megaprime™ DNA Labelling System, Amersham). A filtereket 42 °C-on előinkubáltuk 50 % formamidot, 5xSSC-t, 2x Denhardt-oldatot (0.04 % Ficoll 400, 0.04 % BSA, 0.04 % polivinilpirrolidon), 0.1 % SDS-t és 100 µg/ml denaturált, fragmentált hering sperma-DNS-t tartalmazó pufferben. A hibridizációs elegyhez a radioaktívan jelölt, 5 percig 95 °C-on denaturált DNS próbát adtuk. A filtereket az éjszakán át tartó hibridizálást követően 65 °C-on kétszer mostuk 3xSSC, 0.1 % SDS-t tartalmazó oldattal, majd kétszer 1xSSC, 0.1 % SDS oldattal. A Northern hibridizációs jelek mennyiségi analizisét PhosphorImager-445SI (Molecular Dynamics) és az IMAGE QUANT™ 4.1. verziójú szoftver felhasználásával végeztük.

4.11. Prolin meghatározás

A prolin meghatározást Bates (1973) szerint végeztük. Felhasználás előtt a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk. Kb.100 mg növényt dörzsöltünk el 3 % szulfoszalicilsavat (5 µl/ mg friss tömeg) tartalmazó oldatban kvarchomok segítségével. A kivonatot 10 percig maximális sebességgel centrifugáltuk és a felülúszó 100 µl-éhez 200 µl 96 %-os ecetsavat és 200 µl savas ninhidrint (2,5 % (w/v) ninhidrin, 60 % (v/v) 96 %-os ecetsav, 40 % (v/v) 6 M foszforsav) adtunk. A mintákat 96 °C-on egy órán át

inkubáltuk, majd a lehűlést követően 1 ml toluollal extraháltuk. A keletkező piros színű reakciótermék mennyiségét OD₅₂₀ nm-en végzett spektrofotometriával állapítottuk meg (toluolt használva referencia oldatként). Ismert mennyiségű prolint tartalmazó koncentrációsor felhasználásával kalibrációs görbét készítettünk és ez alapján határoztuk meg a minták prolin koncentrációját. A kísérleteket háromszor ismételtük és legalább három párhuzamos mintát mértünk minden egyes kísérlet során.

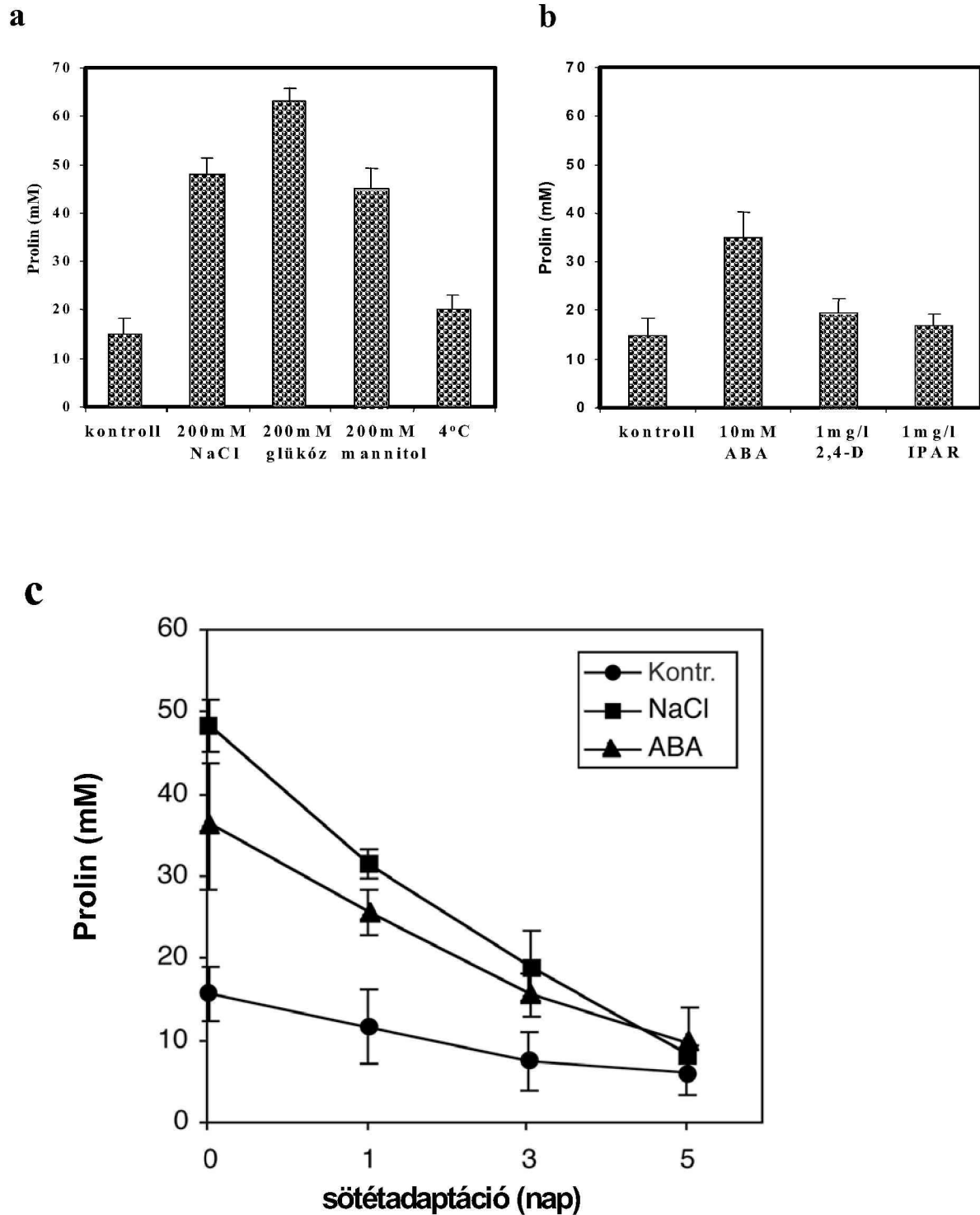
5. Kísérleti eredmények

5.1. Környezeti faktorok és hormonok prolin felhalmozódásra gyakorolt hatása

A növények ozmotikus stresszre adott egyik legjellegzetesebb válaszreakciója a prolin felhalmozódás. Megvizsgáltuk, hogy a különböző környezeti faktorok, illetve növényi hormonok hogyan befolyásolják ezt a stresszválaszt *A. thaliana* modellnövényben. A 3.(a) ábrán látható, hogy a 24 h kezelést követően a kontroll növényekben mért kb. 15 mM szabad prolin szint 200 mM NaCl-kezeléssel 48 mM-ra emelkedett, 200 mM mannitol-kezelést követően pedig kb. 45 mM volt. 200 mM glükóz hatására a prolin szint 63 mM-t ért el. A hideg-kezelés csekély mértékű emelkedést idézett elő a szabad prolin szintjében.

A 3.(b) ábrán megfigyelhetők a szabad prolin szintjében bekövetkező változások a 24 h hormonkezeléseket követően. A kontroll növényekben mért 15 mM szabad prolin szint 10 μ M ABA-kezelés hatására 35 mM-ra emelkedett. Az alkalmazott 1 mg/l IPAR, illetve az 1 mg/l 2,4-D prolin felhalmozódásra gyakorolt hatása nem számottevő (16.8 mM, illetve 19.6 mM).

A vad típusú *Arabidopsis (Col)* csíranövényekben 200 mM NaCl-kezelés hatására a szabad prolin szintje kb. háromszorosára nő, míg ABA-kezelés eredményeképpen kb. 2.5-szeres növekedés tapasztalható. Ez a prolinszint emelkedés sötét előkezeléssel megakadályozható. A 3.(c) ábrán látható, hogy a mért prolinkoncentráció fordítottan arányos a NaCl-, illetve ABA-kezelést megelőző sötétadaptáció hosszával. 5 nap sötétkezelést követően a sötétadaptált kontroll növények szabad prolin szintje 10 mM-ra csökkent és sem ABA-val, sem NaCl-dal nem lehetett növelni a prolin felhalmozást. Ez arra utal, hogy a fénynek fontos szerepe van a prolin bioszintézis és/vagy lebontás szabályozásában.



3.ábra Környezeti faktorok és hormonok hatása a szabad prolin szintjére.

Vad típusú (Col) *Arabidopsis* csíranövények szabad prolin szintjének változása 24 h-n át tartó (a) 200 mM NaCl-, 200 mM glükóz-, 200 mM mannitol- vagy hidegkezelést, illetve (b) 10 μ M ABA, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l IPAR-kezelést követően. (c) 0-5napon át tartó sötétadaptációt követően sötétben elvégzett, 24 h-n át tartó 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezelés hatása 3 hetes *Arabidopsis* (Col) csíranövények szabad prolin szintjére.

5.2. *P5CS* gének izolálása, szekvencia analízise és térképezése

5.2.1. Az *Arabidopsis P5CS* gének klónozása

Munkánk kezdetekor még nem volt ismert az *Arabidopsis*-ban előforduló Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-szintetáz kódoló gén. Dr. Koncz Csaba kölni munkacsoportjában Dr. Nicolai Strizhov és Dr. Szabados László csíranövényből, illetve sejtszuspenziós kultúrából készített cDNS könyvtárak sz. részét végezték. Ehhez egy olyan *Vigna aconitifolia*-ból származó cDNS klónt használtak, amely szekvencia homológiát mutatott az *E. coli proA* génjével. A csíranövényből készített cDNS könyvtárból 6 klónt izoláltak, amelyek nukleotid sorrendje azonos volt a mindeközben Savouré és mtsai által 1995-ben közölt *Arabidopsis P5CS* gén szekvenciájával (EMBL/Genbank azonosító: X86777), illetve néhány nukleotidban tért el a Yoshida és mtsai által 1995-ben közölt *AtP5CS* szekvenciától. A sejtszuspenziós kultúrából készített cDNS könyvtárból pedig 6 olyan klónt izoláltak, amelyek egy új *P5CS* cDNS fragmentumot tartalmaztak. Az izolált második gént *AtP5CS2*-nek nevezték el. 5'-RACE PCR technikával teljes hosszúságú cDNS-t állítottak el (EMBL/Genbank azonosító: Y09355).

5.2.2. Az *AtP5CS* gének szekvencia analízise

Az *AtP5CS1* gén 717 aminosavból álló fehérjét kódol, amely 77,7 kDa molekulatömeg. Az újonnan izolált, *AtP5CS2*-nek elnevezett gén egy 726 aminosavból álló, 78,8 kDa molekulatömegű enzimet kódol. A két *P5CS* gén nukleotidsorrendje 82 %-ban megegyezik. Az általuk kódolt két izoenzim 93 %-ban azonos, vagy hasonló aminosavakat tartalmaz. Az *AtP5CS* cDNS-ek 5' és 3' nem-kódoló régiói 54 %, illetve 53 % szekvencia azonosságot mutatnak, így ezen régiókat lehet felhasználni génspecifikus DNS-fragmentek el állítására.

A 4. ábrán látható az *Arabidopsis* és *Vigna* prediktált *P5CS* fehérjék aminosav sorrendjének összehasonlítása az *E. coli* és *S. marcescens* γ -GK és GSA-DH szekvenciákkal. Konzervált kináz és dehidrogenáz domén, feltételezett ATP- és NADPH-kötő hely és egy leucin-gazdag régió figyelhető meg. A Zhang és mtsai (1995) által a *Vigna* *P5CS* enzimben talált, a feed back gátlásban szerepet játszó két aminosav megtalálható mindkét *Arabidopsis*

		ATP-kötőhely	
ATP5S2	MTE- LDRSRFAKDWKRIWVWUGTAVUTGKCGRLALGRLGAICEQLAELNSDGFVILVSSGAVGLGRQRLRYRQLVNSFPADLQKPQTE	89	
ATP5S1	MEE-LDRSRFAKDWKRIWVWUGTAVUTGKCGRLALGRLGAICEQLAELNSDGFVILVSSGAVGLGRQRLRYRQLVNSFPADLQKPQTE	89	
VAP5CS	MEASADPSPGFMKDWKRIWVWUGTAVUTGKCGRLALGRLGAICEQLAELNSDGFVILVSSGAVGLGRQRLRYRQLVNSFPADLQKPQTE	90	
ECGK	MSDS-----QTLVVKLGTSLTGGSLRLNRAHIVELVRQCAQHAAGHRIVIVTSSAIAAGREHLGYPELF----ATIASKQLL	75	
SMGK	MMGS-----QTLVVKLGTSLTGGSLRLNRAHIVELVRQCAQHAAGHRIVIVTSSAIAAGREHLGYPELF----ATIASKQLL	75	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		feed back gátlóshely	
ATP5S2	LDGKACAGVGQSSLMAYYETHFDQLDUTVAQMLUTDSSTFDKDFRKQLSETVKAMLRMRVIFVFNENDAISTRAPYKDSGIFWINDSL	179	
ATP5S1	LDGKACAGVGQSSLMAYYETHFDQLDUTVAQMLUTDSSTFDKDFRKQLSETVKAMLRMRVIFVFNENDAISTRAPYKDSGIFWINDSL	179	
VAP5CS	LDGKACAGVGQSSLMAYYETHFDQLDUTVAQMLUTDSSTFDKDFRKQLSETVKAMLRMRVIFVFNENDAISTRAPYKDSGIFWINDSL	180	
ECGK	-----AAVGQSRLIQLWEQLFSYGVINVGQMLLTRAEDMEDRERFLNEDRTLRALLDNNIVFVINENDAVATAEIKUGD-----NDNL	152	
SMGK	-----AAVGQSRLIQLWEQLFSYGVINVGQMLLTRAEDMEDRERFLNEDRTLRALLDNNIVFVINENDAVATAEIKUGD-----NDNL	152	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		konzervált Leu zipsár	
ATP5S2	AALLALELKADLLILLSDVEGLYTG-PPSDSTSKLINT-FIKEKHQDEITFGKSKLGRGGATAKVKAAMNAAYGAPUIITSGYAAENI	267	
ATP5S1	AALLALELKADLLILLSDVEGLYTG-PPSDPNSKLINT-FIKEKHQDEITFGKSKLGRGGATAKVKAAMNAAYGAPUIITSGYAAENI	267	
VAP5CS	SALLALELKADLLILLSDVEGLYTG-PPSDPNSKLINT-FIKEKHQDEITFGKSKLGRGGATAKVKAAMNAAYGAPUIITSGYAAENI	268	
ECGK	SALLAAILAGADKLLLLTDQKGLYTAPRSMFQAEIKDVTGIDDALRAIAGDSUGLGTGGWSTKLQADVACRAGIDTIIAAGSXPGR	242	
SMGK	SALLAAILAGADKLLLLTDQKGLYTAPRSMFQAEIKDVTGIDDALRAIAGDSUGLGTGGWSTKLQADVACRAGIDTIIAAGSXPGR	242	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		konzervált Gh-5-kínáz domén	
ATP5S2	SKVLRLGLVGTLPFHQDARLWAPVUDTTSRDMVA--RESSSKLQALSSEDRKKILHDIAVALEUWEKTIKAEMLDVA--AAQAGYEES	354	
ATP5S1	DKVLRLGLVGTLPFHQDARLWAPVUDTTSRDMVA--RESSSKLQALSSEDRKKILHDIAVALEUWEKTIKAEMLDVA--AAQAGYEES	354	
VAP5CS	INVLQQRIGTLPHQDAHEWAQVKEVDAREMAVAAGVREGRRY--LQRKG-NKILLKIAVALEUWEKTIRIEMEADUTAAQAGYEES	355	
ECGSD	MLEQMGIA--KQASVYKLQALSSEDRKKILHDIAVALEUWEKTIRIEMEADUTAAQAGYEES	61	
SMGSD	MLEQMGIA--KQASVYKLQALSSEDRKKILHDIAVALEUWEKTIRIEMEADUTAAQAGYEES	61	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
ECGK	GDUMEGISUGTLPHQDAHEWAQVKEVDAREMAVAAGVREGRRY--LQRKG-NKILLKIAVALEUWEKTIRIEMEADUTAAQAGYEES	332	
SMGK	ADVIEGKPVGTLPFHQDAHEWAQVKEVDAREMAVAAGVREGRRY--LQRKG-NKILLKIAVALEUWEKTIRIEMEADUTAAQAGYEES	332	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		konzervált Gh-5-kínáz domén	
ATP5S2	LVARLVMPGKIKISSLAASVURLAEMEDP IGRVLKGTQVADDLILEKTSSEPGULLIUVESRPDALVQIASLAIRS	444	
ATP5S1	LVARLVMPGKIKISSLAASVURLAEMEDP IGRVLKGTQVADDLILEKTSSEPGULLIUVESRPDALVQIASLAIRS	444	
VAP5CS	LVARLVMPGKIKISSLAASVURLAEMEDP IGRVLKGTQVADDLILEKTSSEPGULLIUVESRPDALVQIASLAIRS	445	
ECGSD	MLDLALTPARLKGIAADVURQVCLADPUGQVIGDGGVLDGLERLRRRFLGVIIVYARPNUTVDVACLCTENAVILRGCKETCRT	151	
SMGSD	MLDLALTPARLKGIAADVURQVCLADPUGQVIGDGGVLDGLERLRRRFLGVIIVYARPNUTVDVACLCTENAVILRGCKETCRT	151	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
ECGK	DALRRIGHHSQIEIDAILGYEYGPVAMHDDMIIR	367	
SMGK	DAMRMIGHHSQIEIDAILGYEYGPVAMHDDMIIR	367	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		NAD(P)H-kötőhely	
ATP5S2	NAILNKVITDAIFE-TVGCKLIGLUTS--REEIPDLLKLDVVDLVIPRGSMKLVSQIKQSTKIPULGHADGICHVYVDKSGKLDMAERI	531	
ATP5S1	NAILNKVITDAIFE-TVGCKLIGLUTS--REEIPDLLKLDVVDLVIPRGSMKLVSQIKQSTKIPULGHADGICHVYVDKSGKLDMAERI	531	
VAP5CS	NAILNKVITDAIFE-TVGCKLIGLUTS--REEIPDLLKLDVVDLVIPRGSMKLVSQIKQSTKIPULGHADGICHVYVDKSGKLDMAERI	532	
ECGSD	NAATVAVIQDALKSCGLPAGAVQIDNPDRLVSEMLRMDKYIDMLIPRGAGLHKLCREQSTIPUITGGIGUCHIVDESVEIAELKV	241	
SMGSD	NQATVAVIQDALKSCGLPAGAVQIDNPDRLVSEMLRMDKYIDMLIPRGAGLHKLCREQSTIPUITGGIGUCHIVDESVEIAELKV	241	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		feltételezett Leu domén	
ATP5S2	VSDAKLDYPAAACNMETLLVHKOLEQNGFLDDLIVYLQTKGVLYGGPRASAKLINIPEIK-----SINHEYSKACTIVEIVEDVYGA	614	
ATP5S1	VSDAKLDYPAAACNMETLLVHKOLEQNGFLDDLIVYLQTKGVLYGGPRASAKLINIPEIK-----SINHEYSKACTIVEIVEDVYGA	614	
VAP5CS	VLDKLDYPAACNMETLLVHKOLEQNGFLDDLIVYLQTKGVLYGGPRASAKLINIPEIK-----SINHEYSKACTIVEIVEDVYGA	615	
ECGSD	IUNAKTQRPSTCMTUTETLLVHKOLEQNGFLDDLIVYLQTKGVLYGGPRASAKLINIPEIK-----SINHEYSKACTIVEIVEDVYGA	331	
SMGSD	IENAKTQRPSTCMTUTETLLVHKOLEQNGFLDDLIVYLQTKGVLYGGPRASAKLINIPEIK-----SINHEYSKACTIVEIVEDVYGA	331	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
		konzervált GSA-DH domén	
ATP5S2	DHINHGSAHTDCIYTEDSEUAEIFLRQDSAAAFHNASTRFSDGFPGLGAEUGISTRIHARGPUGUEGLLTTRNIMRGKQVUDGDM	704	
ATP5S1	DHINHGSAHTDCIYTEDSEUAEIFLRQDSAAAFHNASTRFSDGFPGLGAEUGISTRIHARGPUGUEGLLTTRNIMRGKQVUDGDM	704	
VAP5CS	DHINHGSAHTDCIYTEDSEUAEIFLRQDSAAAFHNASTRFSDGFPGLGAEUGISTRIHARGPUGUEGLLTTRNIMRGKQVUDGDM	705	
ECGSD	AHIREHGTQSDAILTRDMRNQR-----FVNASTRTFDGCGPGLGAEUAVSTQKLHARGPUGUEGLLTTRNIMRGKQVUDGDM	409	
SMGSD	DHINHGSAHTDCIYTEDSEUAEIFLRQDSAAAFHNASTRFSDGFPGLGAEUGISTRIHARGPUGUEGLLTTRNIMRGKQVUDGDM	418	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
ATP5S2	GIYTHKOLPULQRTEAVENG I	726	
ATP5S1	GIYTHKOLPULQRTEAVENG I	717	
VAP5CS	GIYTHKOLPULQRTEAVENG I	716	
		* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	

4. ábra Prediktált AtP5CS1 és AtP5CS2 fehérjék szekvencia analízise.

Az AtP5CS1(ATP5S1) és AtP5CS2 (ATP5S2) fehérjék aminosav sorrendjének összehasonlítása a *Vigna aconitifolia* P5CS (VAP5CS), *E. coli* γ -GK (ECGK) és GSA-DH (ECGSD), és *Serratia marcescens* γ -GK (SMGK) és GSA-DH (SMGSD) fehérjékkel. (*) jelöli az aminosav azonosságot, (.) jelöli a hasonló aminosavakat. Az ábrán feltüntetettük a feltételezett ATP- és NADP(H)-kötőhelyet, a konzervált γ -GK és GSA-DH doméneket, a leucinban gazdag régiót, valamint a γ -GK és P5CS enzimek feed back gátlásában fontos aminosavakat.

P5CS enzimben. A bakteriális γ -GK enzimek feed back gátlásában szerepet játszó aminosavak azonban nem találhatók meg a prediktált AtP5CS fehérjékben.

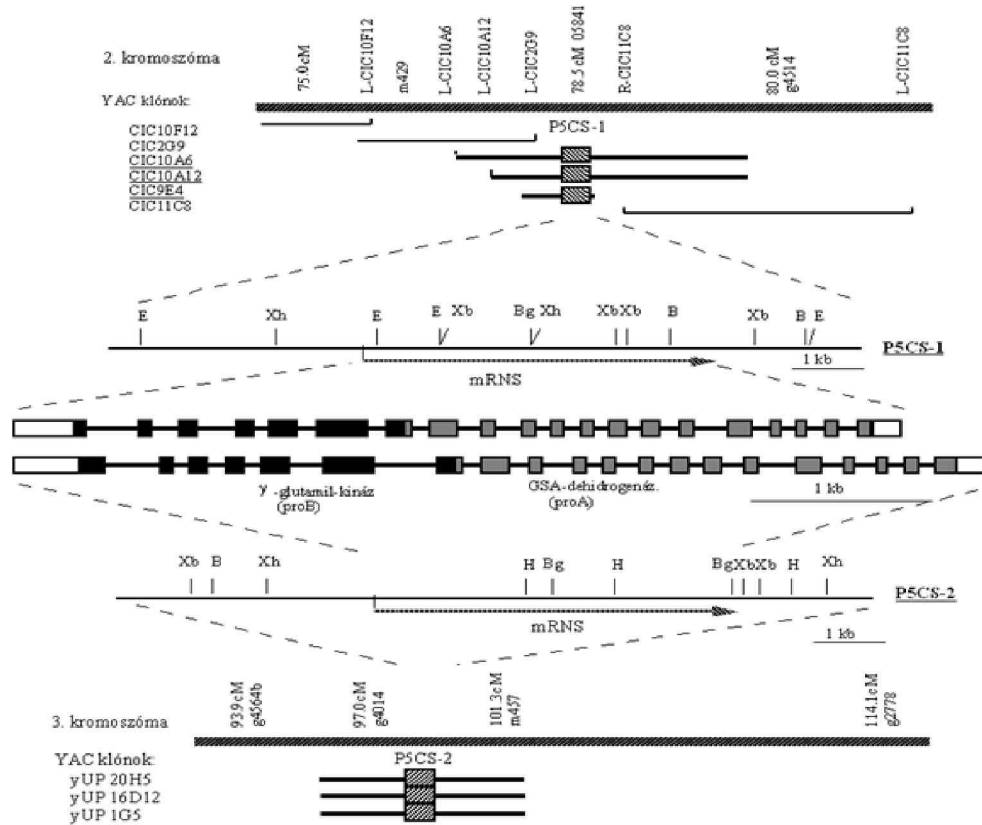
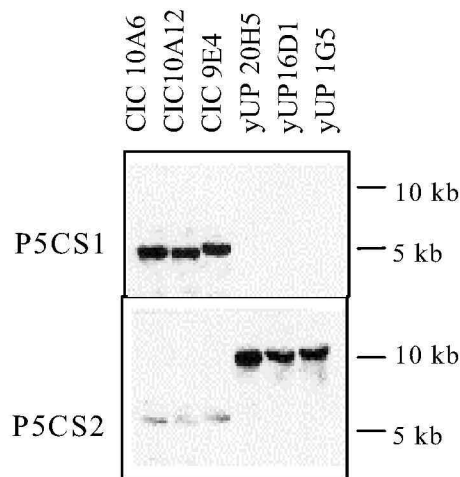
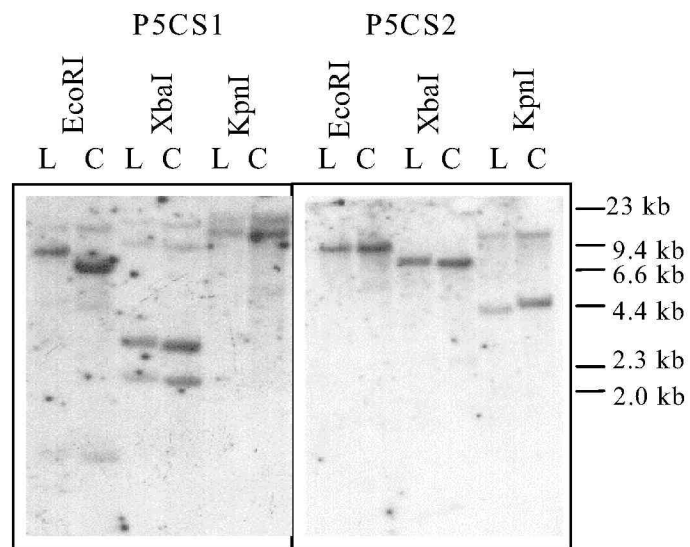
A GCG programcsomag felhasználásával elvégzett szekvencia analízis eredménye az 5.(a) ábrán látható. Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének fizikai térképe eltérő. Az *AtP5CS1* esetében az átírt régió 4.8 kb hosszú, mely 20 exont tartalmaz, az *AtP5CS2* gén átírt régiója pedig 4.9 kb, amelyben 20 exon található. Az exonok hosszúsága a két gén esetén azonos (az utolsó exon kivételével). A két P5CS gén exonjainak nukleotid sorrendje 80-94 %-ban azonosnak bizonyult. Az intronok szekvenciája kisebb mértékben egyezik meg (39-64 %) és a hosszuk is különböző.

5.2.3. *AtP5CS* gének térképezése

Ökrész László segítségével elvégzett Southern hibridizáció eredménye a 5.(c) ábrán látható. A *Columbia-1* és *Landsberg erecta* ökotípusba tartozó *Arabidopsis* csíranövényekből izolált genomi DNS-t EcoRI, XbaI és KpnI restriktációs enzimekkel hasítottuk a Southern hibridizációhoz. A cDNS próbákat használva restriktációs fragment hossz polimorfizmus (RFLP) figyelhető meg az *AtP5CS2* esetén KpnI enzimet használva. Továbbá a Savouré és mtsai (1995) által az *AtP5CS1* esetében megfigyelt EcoRI RFLP-t sikerült igazolni.

Génspecifikus próbákat használva mindkét gént térképeztük YAC-klónokat felhasználva. Az *AtP5CS1* próbát használva hibridizációs jelet kaptunk az egymással átfedő CIC10A6, CIC10A12 és a CIC9E4 YAC klónok esetén, de nem kaptunk jelet a szomszédos CIC10F12, CICG9 és a CIC11C8 klónok esetén (5.(b) ábra). Ezen eredmények alapján pontosítani tudtuk a Savouré és mtsai által 1995-ben közölt *AtP5CS1* térképpozícióját. Eszerint az *AtP5CS1* a 2-es kromoszómán 78,8cM-nál helyezkedik el, közel a 05841 RFLP markerhez, a CIC2G9 YAC klón bal oldali vége és a CIC11C8 YAC klón jobb oldali vége között.

Az *AtP5CS2* génspecifikus próbával elvégzett hibridizáció esetén jelet kaptunk az yUP20H5, yUP16D12 és a yUP1G5 YAC klónok esetében (5.(b) ábra). Halvány hibridizációs jeleket kaptunk a CIC YAC klónok esetében is. Ennek oka az *AtP5CS2* génspecifikus próba előállításához használt primer homológiája a pYAC4 nevű CIC vectorhoz. Mivel az *AtP5CS2* gén térképpozíciója ismeretlen volt, ezért a gént kapcsoltsági analízis segítségével, rekombináns beltenyésztett vonalakat felhasználva Dr. Koncz Csaba térképezte. Az *AtP5CS2*

a**b****c**

5. ábra *AtP5CS* gének genetikai és fizikai térképe.

(a) Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének kromoszómahelyzete, fizikai térképe és vázlatos szerkezete. Felül: az *AtP5CS1* gén pozíciója a 2. kromoszómán, melyet átfedő CIC YAC klónok felhasználásával állapítottunk meg. Középen: az *AtP5CS* gének fizikai térképe és vázlatos exon-intron struktúrája. Alul: az *AtP5CS2* gén, illetve a hibridizáló yUP YAC klónok pozíciója a 3. kromoszómán. Restriktációs enzimek hasítóhelyei: EcoRI (E), XhoI (Xh), XbaI (Xb), BamHI (B), BglII (Bg) és HindIII (H). (b) YAC klónok Southern hibridizációja *AtP5CS1* és *AtP5CS2* génspecifikus próbákkal. (c) *Arabidopsis* genom DNS-en végzett Southern hibridizáció. A *Col-1* (C), illetve *Landsberg erecta* (L) ökotípusokból izolált genom DNS-t EcoRI, XbaI és KpnI restriktációs endonukleázokkal hasítottuk. Hibridizáláshoz a génspecifikus próbákat használtuk fel.

gén a 3. kromoszóma 101,3cM helyére térképeződött, közel az m457 RFLP markerhez.

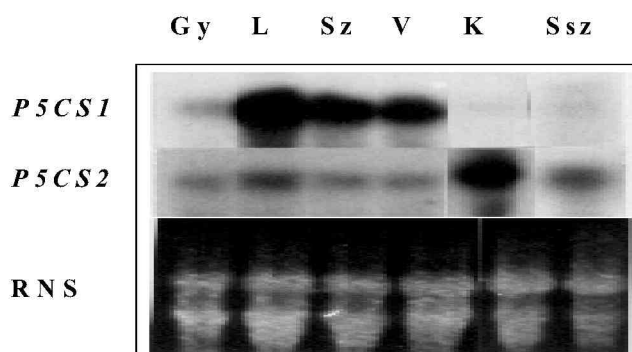
5.3. Génexpresszió vizsgálata Northern hibridizációval

5.3.1. *AtP5CS* gének szövetspecifikus expressziójának vizsgálata

A két *P5CS* gén szövetspecifitásának tanulmányozásához *Arabidopsis thaliana* (*Columbia-1* ökotípus) növények gyökeréből, szárából, leveléből, virágából, valamint kalluszból és gyökéreredetű sejtszuspenziós kultúrából össz RNS-t izoláltunk és Northern hibridizációt végeztünk génspecifikus próbák felhasználásával. A hibridizáció eredménye a 6. ábrán látható.

Az *AtP5CS1* mRNS mennyisége gyökérben alacsony, szárban, levélben és virágban pedig nagy mennyiségű transzkript található. Gyökéreredetű sejtszuspenzióban és kalluszból nincs kimutatható mennyiségű mRNS.

Az *AtP5CS2* mRNS-szintje a legtöbb szervben kb. 20-30 %-a az *AtP5CS1* mRNS szintjének. Azonban az aktívan osztódó kalluszból erős, a gyökéreredetű sejtszuspenzióban pedig közepes erősségű hibridizációs jelet kaptunk az *AtP5CS2* esetében.



6. ábra Az *AtP5CS* gének szerv-, illetve szövetspecifikus kifejeződésének Northern hibridizációs vizsgálata.

Gyökérből (GY), levélből (L), szárból (SZ), virágból (V), kalluszból (K) és sejtszuspenziós kultúrából (Ssz) izolált 20 µg össz RNS-t használtunk a génspecifikus próbákkal elvégzett hibridizációhoz.

5.3.2. Környezeti faktorok hatása az *AtP5CS* gének expressziójára

Kísérleteinkben környezeti faktorok *AtP5CS* génekre gyakorolt hatását vizsgáltuk különböző kísérleti rendszerekben Northern hibridizáció segítségével. A kísérleti eredmények a 7. ábrán láthatóak.

Fény szerepe

A fény *P5CS* gének expressziójára gyakorolt hatását vizsgáló kísérletben 4 hétig fényen nőtt növényeket 3 nap sötétadaptációnak vetettünk alá. A Northern hibridizáció eredménye a 7.(a) ábrán látható. A sötét kb. 40-50 %-kal csökkentette az *AtP5CS1* gén expresszióját, míg az *AtP5CS2* génre nem volt hatással.

Kiszáritás hatása

A kísérletben 4 hetes növényeket használtunk és a növénytenyészt üvegek fedelét 6, illetve 24 órára eltávolítottuk a mintavételt megelőzően. A kiszáradás 5-6-szoros emelkedést idézett elő az *AtP5CS1* gén mRNS-ének mennyiségében, míg az *AtP5CS2* gén kifejeződését kevésbé, kb. kétszeresére növelte (7.(a) ábra)

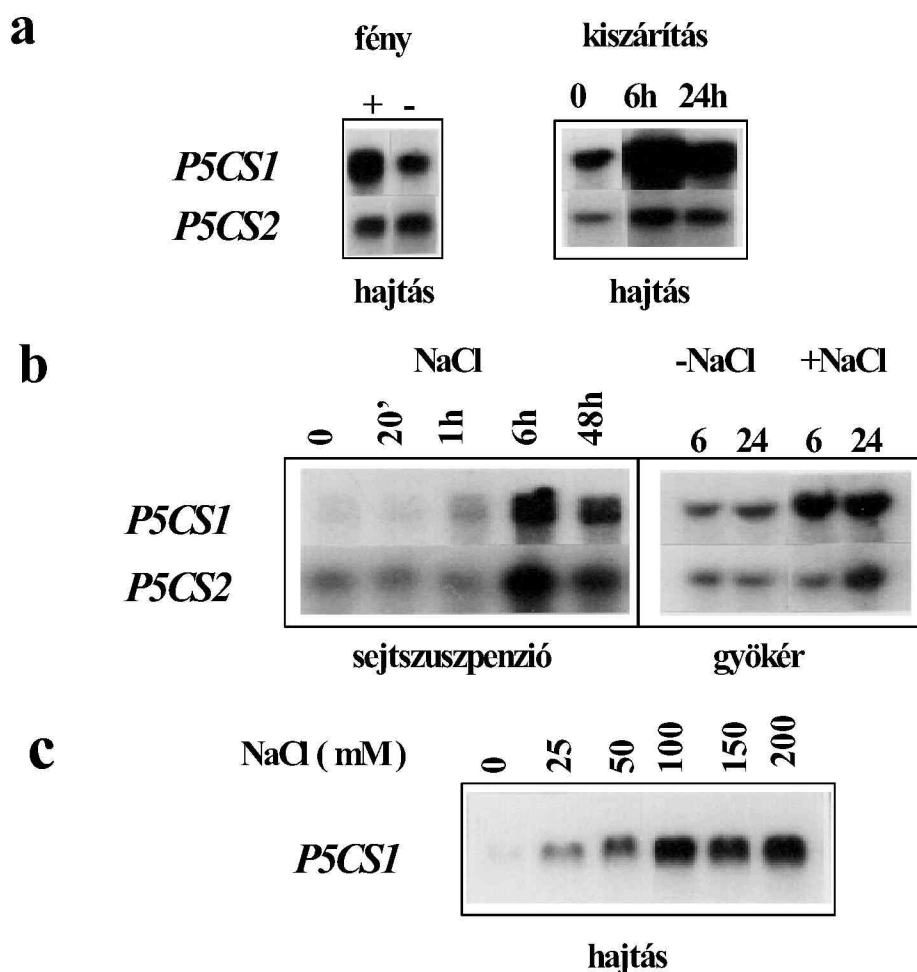
NaCl-kezelés hatása

A NaCl hatását vizsgáltuk sejtszuspenziós kultúrában. A 200 mM NaCl-dal kezelt sejtszuspenzióból 20', 1 h, 6 h és 48 h múlva mintát vettünk. A Northern hibridizáció eredménye a 7.(b) ábrán látható. Az *AtP5CS1* gén esetében az expresszió NaCl hiányában nem detektálható, a só hozzáadását követően 20' múlva a génexpresszió kismértékben emelkedett. A maximális expresszió 6 h elteltével figyelhető meg, amely 48 h után kismértékben csökken. Az *AtP5CS2* gén esetében NaCl hiányában is detektálható a génkifejeződés, amely a só hozzáadását követően 1 h-n belül nem változik. A NaCl a hozzáadást követően 6 h elteltével fejtette ki maximális hatását, amely 48 h múlva kismértékben csökkent.

A 200 mM NaCl-kezelés hatását Erlenmeyer lombikban folyékony ½ MSAR tápoldatban 50 rpm rázatás mellett növesztett gyökérkultúra esetében is vizsgáltuk. A 7.(b)

ábrán látható, hogy gyökerekben NaCl hatására az *AtP5CS1* gén erősen indukálódik, az expresszió 6 h elteltével elérte maximumát és nem változott 24 h múlva sem. Az *AtP5CS2* gén esetében kismértékű és lassúbb indukciót tapasztaltunk.

A NaCl-kezelés hatását vizsgáló harmadik kísérletben *Arabidopsis* csíranövényeket 8 napig 0, 25, 50, 100, 150 és 200 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajon növesztettünk. A növényekből izolált össz RNS-t az *AtP5CS1* próbával hibridizáltuk. A 7. (c) ábrán jól látható, hogy 25 mM NaCl-kezelés is jelentősen megnövelte az *AtP5CS1* gén expresszióját. 100 mM felett az alkalmazott NaCl koncentráció már nem növelte tovább a génexpressziót.

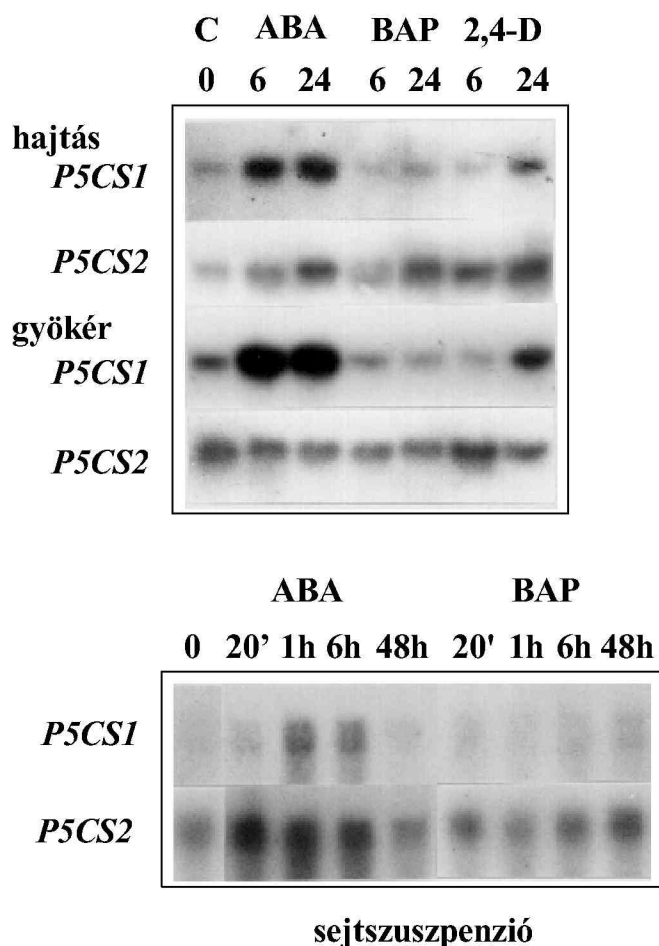


7. ábra Környezeti faktorok hatása az *AtP5CS* gének mRNS szintjére.

(a) 4 hetes vad típusú *Arabidopsis* növények 3 napig tartó sötétadaptációjának (bal oldali panel) valamint 6, illetve 24 h-n át tartó kiszárításának hatása (jobb oldali panel). (b) 200 mM NaCl hatása az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének mRNS-ének felhalmozódására sejtszuszpenzióban (bal oldali panel) és gyökérkultúrában (jobb oldali panel). A kezelések időtartamát feltüntettük az ábrán. (c) Vad típusú *Arabidopsis* magok különböző koncentrációjú NaCl-ot tartalmazó táptalajon történő csíráztatásának hatása az *AtP5CS1* gén mRNS szintjére. Az alkalmazott NaCl-koncentrációkat feltüntettük az ábrán.

5.3.3. Hormonok hatásának vizsgálata

A különböző hormonok prolin felhalmozódásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az abszcizinsav-kezelés jelentős mértékben megnövelte *A. thaliana*-ban a szabad prolin szintjét (ld. 5.1 pont, 3.(b) ábra), ezért megvizsgáltuk a prolin felhalmozódásban kulcsszerepet játszó kétfunkciós enzimet kódoló gének expressziójára gyakorolt hatását. Az egyéb növényi hormonok, pl. az auxin és citokinin ozmotikus stresszválaszban betöltött szerepéről még kevés adat állt rendelkezésre, ezért munkánk során a citokinin (BAP), és az auxin (2,4-D) hatását is vizsgáltuk különböző kísérleti rendszerekben. A Northern hibridizáció eredménye a 8. ábrán látható.



8.ábra Hormonok hatása az *AtP5CS* gének mRNS szintjére.

Felső panel: 4 hetes vad típusú *Arabidopsis* növények, illetve gyökérkultúra 6, illetve 24 h-n át tartó 1 μ M ABA-, 1 mg/l BAP-, 1 mg/l 2,4-D- kezelésének hatása az *AtP5CS* gének mRNS szintjére. Alsó panel: sejtszuszpenzió (hormonmentes tápoldattal való mosást követő) 1 μ M ABA-, illetve 1 mg/l BAP-kezelésének az *AtP5CS* génkifejeződésre gyakorolt hatása. Az ábrán feltüntetett időpontokban mintát vettünk a génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizációhoz.

Levélben és gyökérben az ABA-kezelés 5-6-szoros indukciót eredményezett az *AtP5CS1* gén esetében. A 2,4D hatása kisebb mértékű (maximum kétszeres) volt. A BAP *AtP5CS1* gén kifejeződésére gyakorolt hatása kevésbé egyértelmű. Gyökérkultúrában nem befolyásolta az expressziót, míg levelekben kismértékben csökkentette.

A hormonok *AtP5CS2* génkifejeződésre gyakorolt hatása eltér az *AtP5CS1* gén esetében megfigyelttől. Az ABA kisebb mértékben és lassabban fejti ki hatását levelekre, míg gyökérkultúrában nincs hatása. Az auxin (2,4-D) és a citokinin (BAP) is kismértékben megemelte az *AtP5CS2* gén kifejeződését levelekben. Gyökérkultúrában ezen hormonok hatását nem sikerült kimutatni.

Sejtszuszpenzióban mindkét gén gyorsan reagált a tápoldathoz adott 1 μ M ABA-ra. Az *AtP5CS1* gén 1 h alatt érte el az indukció maximumát, amely 6 h elteltével csökkent, 48h elteltével pedig visszatért az alapszintre. Az *AtP5CS2* gén indukciója gyorsabban, már 20' alatt maximális lett és 48 h elteltével ez is visszatért az alapállapotba. 1 mg/l citokinin (BAP) hatására az *AtP5CS1* gén mRNS szintje nem változott, az *AtP5CS2* gén kismértékben indukálódott.

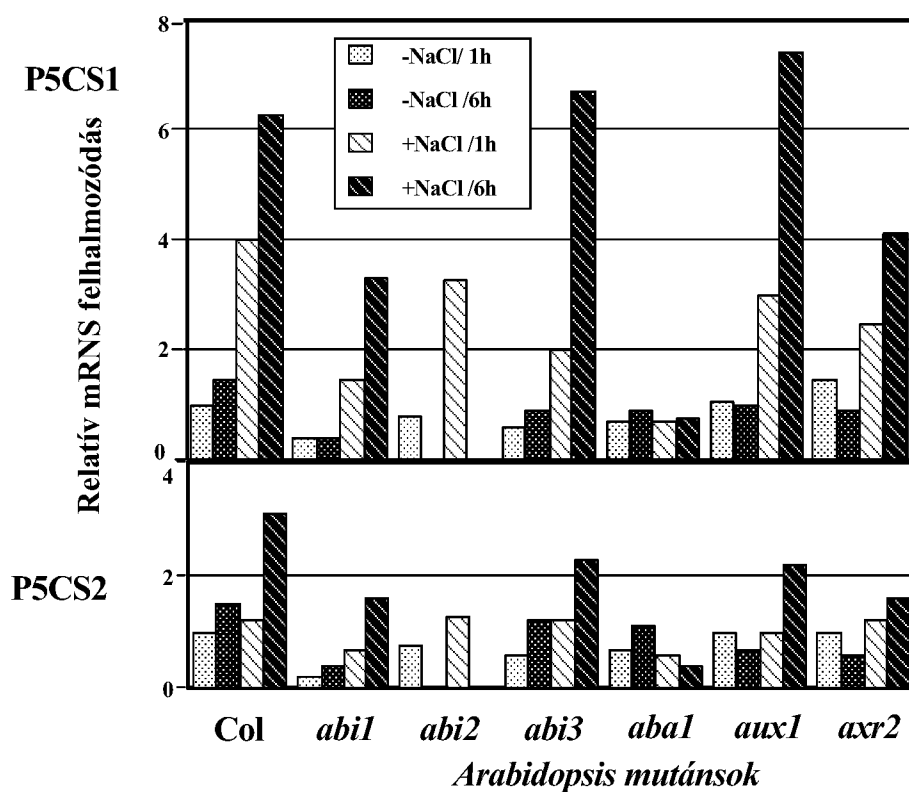
5.3.4. Az *AtP5CS* gének vizsgálata *Arabidopsis* mutánsokban

Korábbi irodalmi adatok és saját kísérleti eredményeink szerint a növényi hormonoknak szerepük van az *AtP5CS* gének kifejeződésében. A hormonok hatásának vizsgálatában a táptalajhoz külsőleg hozzáadott hormonok mellett jelentős szerepe van a hormon-mutáns növényeknek is. Kísérleteinkben az ABA érzékenységet, illetve az ABA szintézist érintő mutációk hatását vizsgáltuk a NaCl-dal kiváltott *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének mRNS szint növekedésére. A kísérleteinkben az ABA-t nem tartalmazó *aba1-1* (a mutáció az ABA bioszintézis egyik lépését érinti: Koornneef és mtsai 1982), az ABA-inszenzitív *abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1* (a mutáció az ABA jelátvitelének különböző lépéseit érinti: Koornneef és mtsai 1984), az auxin/etilén rezisztens *aux1-7* (Pickett és mtsai, 1990), és az auxin/etilén/ABA rezisztens *axr2* (Wilson és mtsai, 1990) *Arabidopsis* mutánsokat használtuk fel. A Northern hibridizáció számszerűsített eredménye a 9. ábrán látható.

Az *aba1-1* mutáns esetén a 200 mM NaCl kezelés hatására nem indukálódott egyik *AtP5CS* gén sem, jelezve az ABA kulcsfontosságú szerepét a két gén NaCl-okozta aktiválódásában.

A vad típusú növényekhez képest az *abi1-1* és az *axr2-1* mutánsokban kb felére csökkent az *AtP5CS1* NaCl-dal kiváltott indukciója 1 h, illetve 6 h elteltével. Az *abi1-1* mutánsban az *AtP5CS1* alapaktivitása is kb. a felére csökkent a vad típusú növényekkel összehasonlítva. Az *axr2* mutációnak az alapaktivitást befolyásoló hatása nincs.

Az *AtP5CS2* gén aktiválódása is kisebb NaCl hatására az *abi1-1* és az *axr2-1* mutánsokban. A gén hosszabb idő alatt bekövetkező indukciója miatt ez a csökkenés csak 6 h elteltével figyelhető meg.



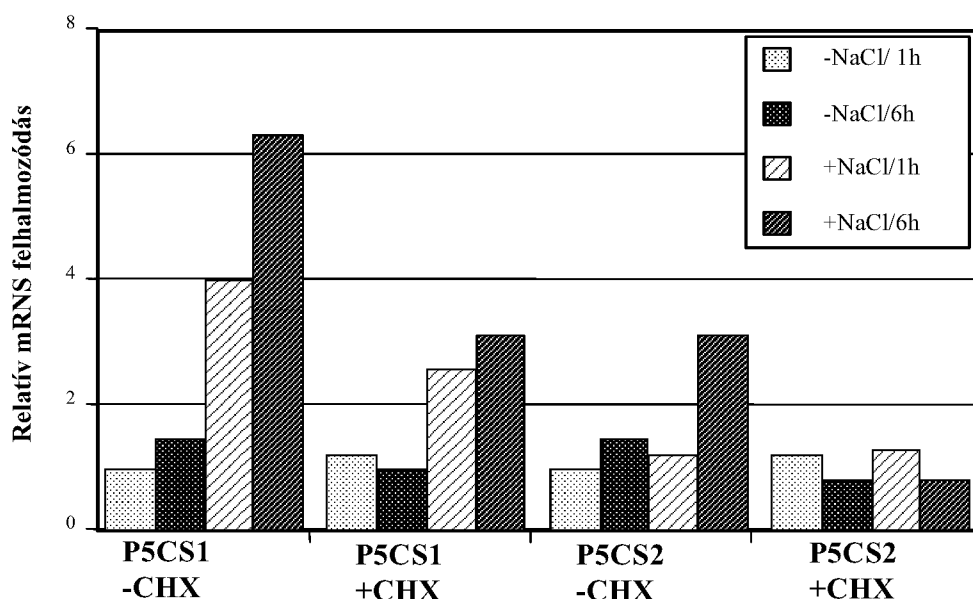
9.ábra Az *AtP5CS* gének NaCl-okozta aktiválódásának vizsgálata mutáns vonalakban.

1, illetve 6 h-n át tartó 200 mM NaCl-kezelés hatása vad típusú (*Col*), *abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1*, *aba1-1*, *aux1-7* és *axr2* mutánsokban az *AtP5CS* génkifejeződésre. Az ábrán a génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizáció számszerűsített eredménye látható. Az értékeket a NaCl-kezelés nélküli vad típushoz viszonyítottuk. Az *abi2-1* esetében csak 1 h NaCl-kezelést alkalmaztunk.

Az *abi2-1*, *abi3-1* és *aux1-7* mutációk nem befolyásolták jelentős mértékben az *AtP5CS* gének NaCl-kezelés hatására létrejövő indukcióját.

5.3.5. Fehérjeszintézis gátlásának hatása az *AtP5CS* gének NaCl-okozta indukciójára

Ebben a kísérletben a fehérjeszintézis cikloheximiddel történő gátlásának hatását vizsgáltuk a két gén NaCl-kezeléssel kiváltott indukciójában. A Northern hibridizáció számszerűsített eredménye a 10. ábrán látható.



10. ábra Cikloheximid hatása az *AtP5CS* gének NaCl-okozta aktiválódására.

2 hetes csíranövények 1 h-n át tartó 0.2 mM cikloheximid-előkezelésének hatása az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének 200 mM NaCl-kezeléssel kiváltott indukciójára. A génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizáció számszerűsített eredménye látható az ábrán. Mindkét gén esetében a hibridizáció során kapott jeleket az Image QuantTM 4.1 verziójú szoftverrel analizáltuk, és a cikloheximid- és NaCl-kezelés nélküli kontrollhoz viszonyítottuk.

A 0.2 mM cikloheximiddel 1 órán át előkezelt kéthetes növényeknél csekély mértékű (25 %) csökkenést tapasztaltunk a 200 mM NaCl okozta indukcióban 1 h elteltével az *AtP5CS1* gén esetén. A további mRNS-szint emelkedést (amely a cikloheximiddel nem kezelt növények esetében 6 h alatt elérte a maximumát) azonban a cikloheximid teljesen megakadályozta.

A NaCl kezelés hatására az *AtP5CS2* mRNS szint lassúbb emelkedést mutatott és 6 h alatt elérte a maximális 2-3-szoros növekedést. A csíranövények cikloheximiddel történő előkezelése ezen gén esetében is megakadályozta a hosszabb idő alatt lezajló indukciót.

5.3.6. Sötétadaptáció hatása a prolin metabolizmus enzimeit kódoló gének kifejeződésére

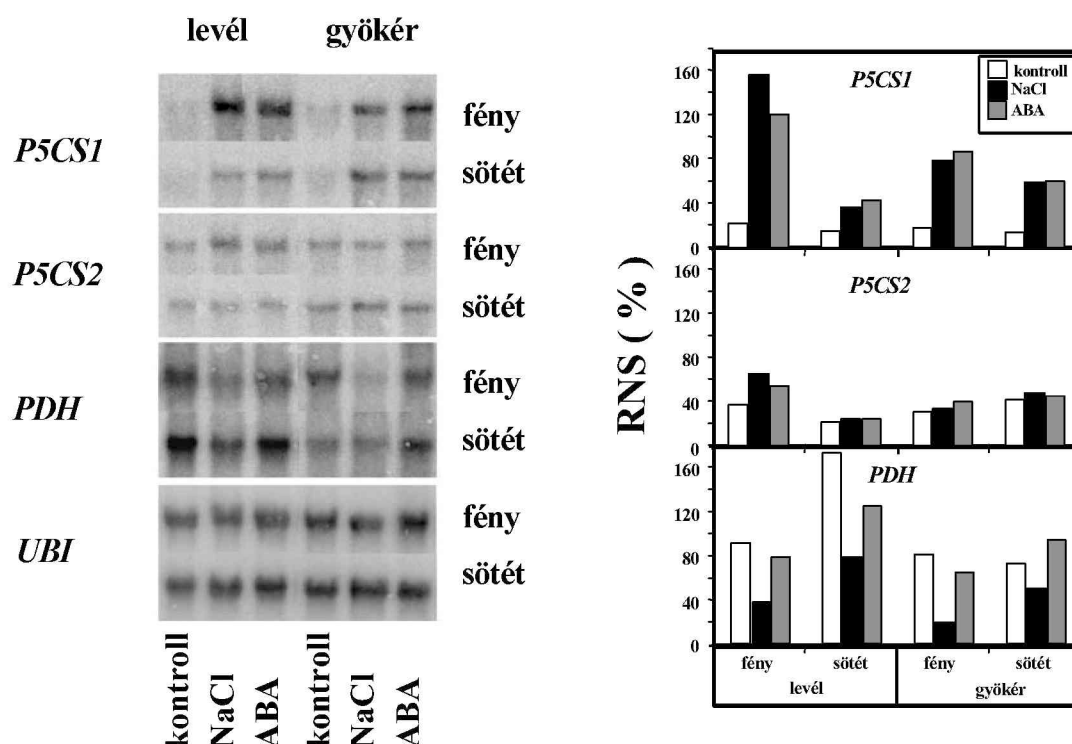
Korábbi kísérletekben tanulmányoztuk a NaCl és az ABA *AtP5CS* génekre gyakorolt hatását. Mivel növényekben a szabad prolin szintjét a bioszintézisen kívül a lebontás is befolyásolja, ezért a további kísérleteinkben megfigyeltük a prolin lebontás első enzimét, a prolin dehidrogenázt (PDH) kódoló gén működését is.

3 hetes rövidnappalos körülmények között növesztett *Arabidopsis (Col)* növényeket 200 mM NaCl-dal, illetve 10 μ M ABA-val kezeltük 24 órán keresztül. A növények egy részét a kezeléseket megelőzően három nap sötétadaptációnak vetettük alá (ezen növények ABA-, illetve NaCl-kezelése is sötétben történt). Northern hibridizáció segítségével figyelemmel kísértük a *P5CS1*, *P5CS2* és *PDH* gének steady state mRNS szintjének változását. A kísérleti eredmények a 11. ábrán láthatóak.

A fényben növesztett növények hajtásában és gyökereiben is nagymértékben megemelkedett az *AtP5CS1* mRNS szintje mind ABA-, mind pedig NaCl-kezelés hatására (4-8-szoros növekedés). Sötétadaptációt követően ez a növekedés igen jelentős mértékben csökkent (kb. 66-75 %-kal hajtásokban, és 30-40 %-kal gyökerekben) mind NaCl-, mind pedig ABA-kezelés esetében.

A fenti körülmények között az *AtP5CS2* gén kevésbé volt indukálható (hajtásokban kb. 1.5-szeres emelkedés, gyökerekben nem kimutatható a változás). A *P5CS2* gén kismértékű indukálhatóságát is megakadályozta a sötét kezelés a növények hajtásaiban, de a gyökerekben kb. kétszeresére nőtt a *P5CS2* mRNS szintje.

A *PDH* mRNS szintje hajtásokban és gyökerekben is a sókezelés eredményeként kb. 60-70 %-kal, míg az ABA-kezelés hatására 30-40 %-kal csökkent. A sötétkezelt növények hajtásaiban a *PDH* mRNS szintje kb. kétszeresére nőtt a kezelt és a kezeletlen (kontroll) növények esetén is. Hasonló hatás figyelhető meg só-, illetve ABA-kezelt növények gyökereiben, de a kontroll növények gyökereiben a *PDH* mRNS szintje nem változott jelentősen.



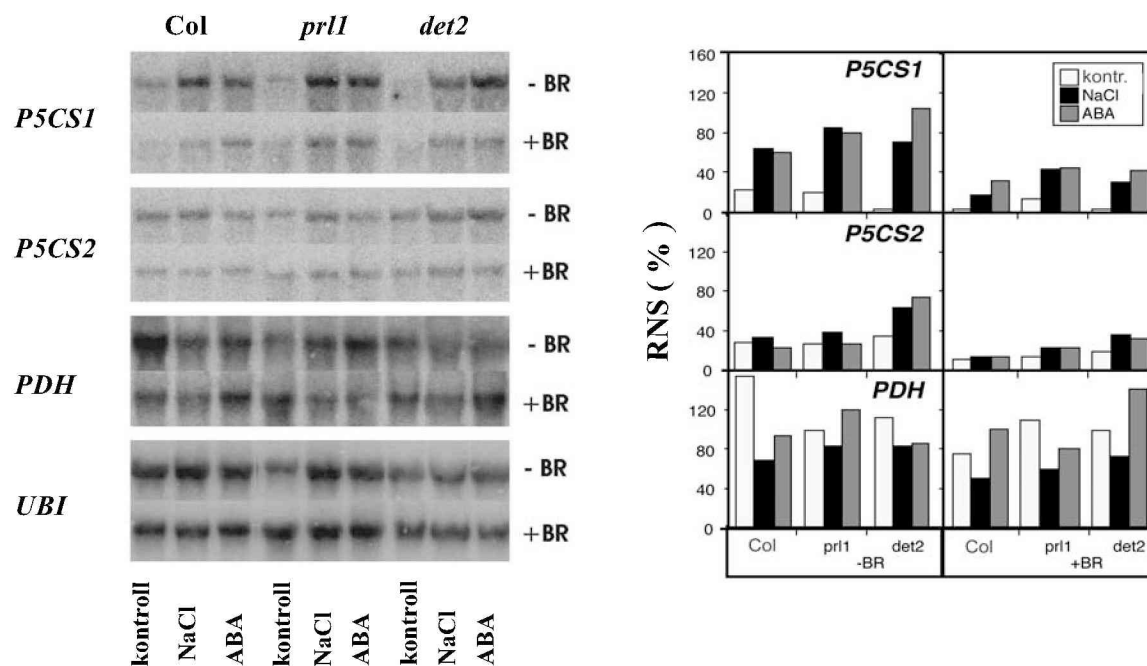
11. ábra Sötétadaptáció hatása a prolin metabolizmus enzimeit kódoló gének mRNS szintjére.

A fényben, ill 3 nap sötétadaptációt követően sötétben elvégzett 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezelés hatása az *AtP5CS1*, *AtP5CS2* és *PDH* gének mRNS szintjére. A jobb oldali panelen a génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizáció számszerűsített eredménye látható. Az Y tengely mentén megadott RNS (%) értéket az Image QuaNT 4.1 verziójú szoftver (Melecular Dynamics) felhasználásával elvégzett mennyiségi analízis során a következő képlet alapján számoltuk: $RNS (\%) = 100 \times d1/d2$, ahol d1 a génspecifikus, a d2 pedig a kontroll ubiquitin próbával elvégzett hibridizálás során kapott jel nagyságát jelenti. A kísérletet háromszor ismételtük, és az ábrán egy tipikus kísérleti eredményt mutatunk be.

5.3.7. 24-epibrassinolid hatásának vizsgálata

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a fénynek fontos szerepe van a prolin felhalmozódásban. Ismert, hogy *Arabidopsis*-ban a brasszinoszteroid-hiányt okozó mutációk transzkripcionális szinten derepresszálják a fény által szabályozott géneket sötétben, és számos stressz-indukálható gén aktivitását fokozzák (Szekeres és mtsai, 1996; Li és mtsai, 1996). Ennek ismeretében arra a kérdésre kerestünk választ, vajon a brasszinolid befolyásolja-e a prolin metabolizmusban szereplő enzimeket kódoló géneket. Munkánk során a vad típusú

(*Col-1*) *Arabidopsis* mellett felhasználtuk a *det2* (Li és mtsai, 1996) és *prl1* (Németh és mtsai, 1998) mutánsokat is. A *det2* növényekben a mutáció a brassinoszteroid bioszintézis egyik lépését érinti, így ezen növények nem tartalmazzak BR-t. A hormon hiánya miatt a fényindukált gének sötétben is működnek. A *prl1* mutáció pedig ABA-ra, glükózra, szacharózra és különböző stressztényezőkre is túlérzékenyvé teszi a növényeket. Ezen mutációk prolin metabolizmus enzimeket kódoló génekre gyakorolt hatásának vizsgálatához 3 hetes, fényen növesztett vad típusú (*Col-1*), *det2* és *prl1* növényeket 200 mM NaCl-dal, illetve 10 μ M ABA-val kezeltünk 24 h-n át. A növények egy részét a kezelések előtt 3 napig 0.1 μ M epi-brassinoliddel előinkubáltuk, ebben az esetben a NaCl-, illetve az ABA-kezelést is 24-epibrassinolid jelenlétében végeztük. A kezelés után mintát vettünk Northern hibridizációhoz, melyhez a génspecifikus próbákat használtuk fel. A kísérlet eredménye a 12. ábrán látható.



12. ábra 24-epibrassinolid és különböző mutációk hatása a prolin metabolizmus kulcsenzimeit kódoló gének működésére.

3 nap 0.1 μ M 24-epibrassinolid-előkezelés hatása a 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezeléssel kiváltott *AtP5CS1*, *AtP5CS2* és *PDH* mRNS-szintek változására vad típusú (*Col-1*), *det2* és *prl1* növényekben. Az ábra jobb oldali részén a 24 h-n át tartó kezeléseket követően a génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizáció számszerűsített eredménye látható (melyet a 10. ábra esetén leírthoz hasonlóan számoltunk). Az ábrán a háromszor ismételt kísérletek során kapott tipikus eredményt mutatjuk be.

A *prl1* mutáns növényekben a vad típusú (Col) növényekhez viszonyítva 1.6-1.8-szeres emelkedést tapasztaltunk a *P5CS1* gén kifejeződésében ABA- és sókezelés hatására. Hasonló emelkedés figyelhető meg a *P5CS1* mRNS szintjében a *det2* mutánsban ABA-kezelés hatására. A vad típusú növényekhez hasonlóan a mutáns csíranövények ABA- és sóindukciót megelőző, 3 napig tartó 0.1 μ M 24-epi-brassinolid előkezelése drasztikusan csökkentette a *P5CS1* mRNS szintjét a *prl1* és *det2* mutánsokban. Tehát ezen mutációk nem enyhítették a brassinoszteroid *P5CS1* expressziójára gyakorolt gátló hatását.

NaCl-, illetve ABA-kezelést követően a *P5CS2* mRNS-szintje a vad típusban és a *prl1* mutánsban megegyezett. A *det2* mutánsban a fenti kezelések hatására a *P5CS2* mRNS-szintje kb. kétszerese a vad típusban talált mennyiségnek. A BR-előkezelés hatására kb. 50 %-kal csökkent mind a vad típusban, mind a vizsgált mutáns vonalakban található *P5CS2* mRNS szintje alapállapotban, valamint NaCl- és ABA-kezelést követően is.

A vad típusú növények esetében a brasszinolid-előkezelés csökkentette a *PDH* mRNS mennyiségét. A *prl1* és *det2* mutánsok esetében kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk.

5.4. Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterek jellemzése

5.4.1. Az *AtP5CS* promóterek szekvencia analízise

Az ozmotikus stressz által aktivált jelátviteli utak számos gén expresszióját megváltoztatják. Ezen gének promóterében található rövid, nagyon konzervált DNS-szakaszokhoz (ún. cisz-elemekhez) kapcsolódó transzkripciós faktorok okozzák a génexpresszió megváltozását. Mivel az *AtP5CS* gének is ozmotikus stressz és ABA-által befolyásoltak, ezért megvizsgáltuk, hogy ezen gének promóterében a már ismert cisz-elemek közül melyek találhatóak meg. Az 1. táblázatban látható a PlantCARE adatbázis (Lescot és mtsai, 2002) felhasználásával elvégzett szekvencia analízis eredménye. Csak azon cisz elemeket tüntettük fel, ahol az *AtP5CS* promóterekben előforduló szekvencia teljesen megegyezett az adott konzervált elem magjával (core: táblázatban nagybetűvel jelölve).

AtP5CS1
promóter

Cisz-elem	Konszenzus szekvencia	Transzláció startpontjától való távolság
ABRE	CACGTG	-599
C repeat/DRE	ttcCCGAC	-477
G-box	ccACGTaa	-721
GT-1 box	GGTTAAAt	- 102
I Box	GATAAgaag	- 623
I Box	GATAAgcag	- 239
MRE	AACCtat	-709
MRE	AACCtat	-709

AtP5CS2
promóter

ABRE	CACGTG	-1000
C repeat/DRE	tgtCCGAC	-238
G-box	aACGTg	-882
MBS	CAACtg	-515
MRE	AACCtaa	-1060
MRE	AACCaaa	-1152

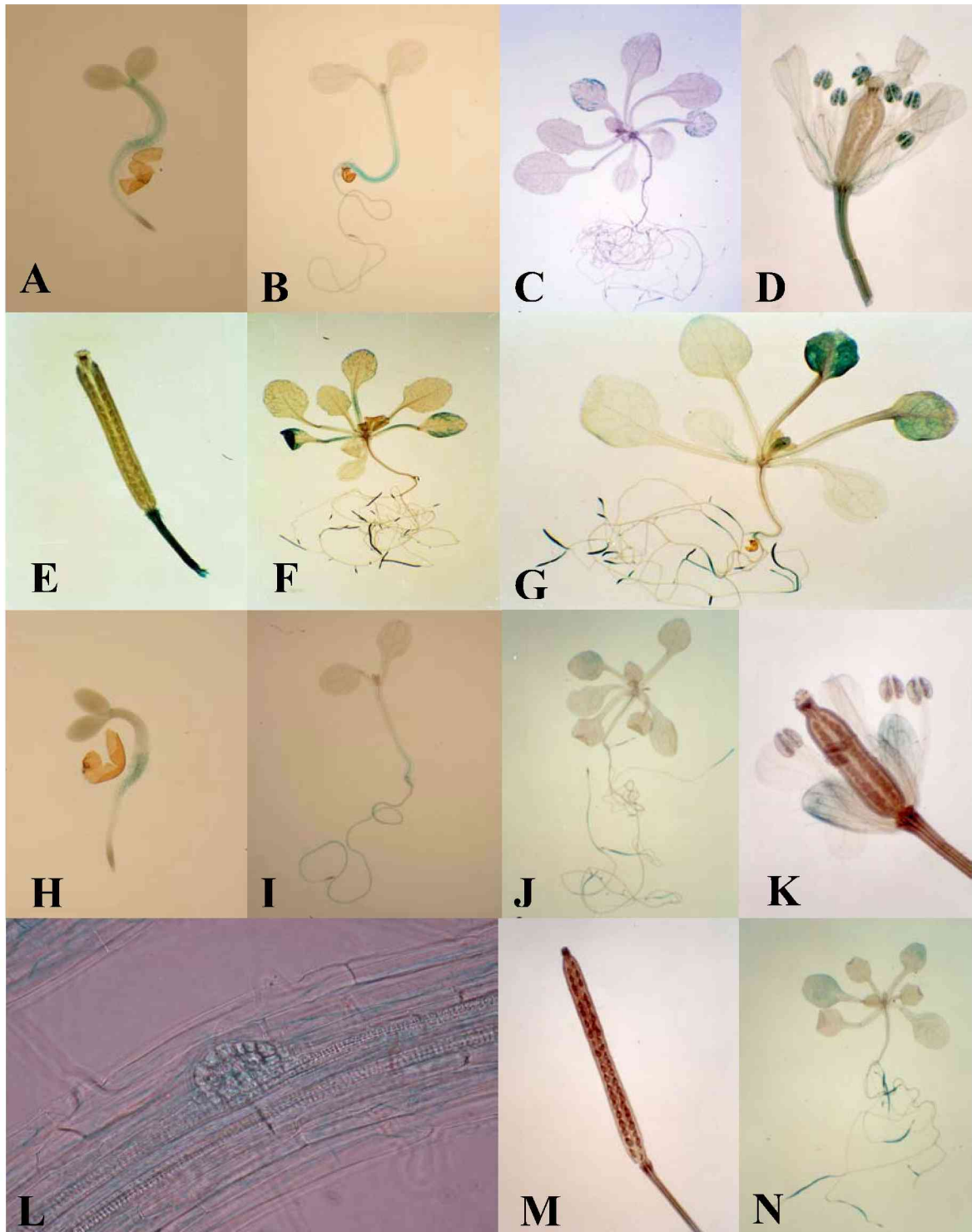
1. táblázat Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterekben található feltételezett cisz-elemek.

A PlantCARE adatbázis felhasználásával elvégzett szekvencia analízissel azonosított feltételezett transzkripció faktor-kötőhelyek. ABRE: ABA Responsive Element (ABA-ra reagáló elem); DRE: Drought Responsive Element (vízhiányra reagáló elem); MRE: Myb Recognition Element (Myb felismerő elem); MBS: Myb Binding Site (Myb-kötő hely)

5.4.2. Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterek működésének vizsgálata GUS hisztokémiai analízissel

Az *AtP5CS* gének szövetspecifikus kifejeződésének részletesebb tanulmányozásához olyan génmódosított *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre, amelyek hordozták az *AtP5CS1::GUS*, illetve az *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat. Független transzformáns vonalak GUS enzimaktivitásának hisztokémiai analízise a két promoter aktivitásának tér- és időbeli eltérését mutatta. A GUS hisztokémiai analízis eredménye a 13. ábrán látható.

Az *AtP5CS1* promoter aktivitása figyelhető meg 3 napos csíranövények esetében a hipokotilban és a gyökerekben (gyökércsúcsban nem volt festődés). 7 napos csíranövényeknél



13. ábra Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterek működésének GUS hisztokémiai analízise.

AtP5CS1::GUS riporter génkonstrukciót hordozó vad típusú (*Col-1*) növények hisztokémiai analízise 3 napos (A), 7 napos (B), 14 napos (C) csíranövényben, üvegházban nevelt növény virágában (D) és termésében (E), illetve 2 hetes csíranövények 10 μ M ABA- (F), illetve 200 mM NaCl-kezelését (G) követően. *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciót hordozó vad típusú (*Col-1*) növények hisztokémiai analízise 3 napos (H), 7 napos (I), 14 napos (J) csíranövényben, üvegházban nevelt növény virágában (K) 2 hetes csíranövény gyökerében 20x nagyítás mellett (L), üvegházi növény termésében (M), illetve 2 hetes csíranövények 10 μ M ABA-kezelését (N) követően.

a hipokotil gyökérnyakhoz közeleső része festődött legerősebben, valamint a gyökerek (gyökércsúcsot kivéve). 2 hetes csíranövényeknél a gyökércsúcs kivételével a gyökerek festődtek, valamint a levelek (nem minden levél festődött és nem egyforma erősséggel). Üvegházban nevelt növényeknél levelekben, szárban, portokban láttunk festődést. 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezelést követően elvégzett hisztokémiai analízis a promóter működésének emelkedését mutatta, az aktivitás térbeli mintázata nem változott.

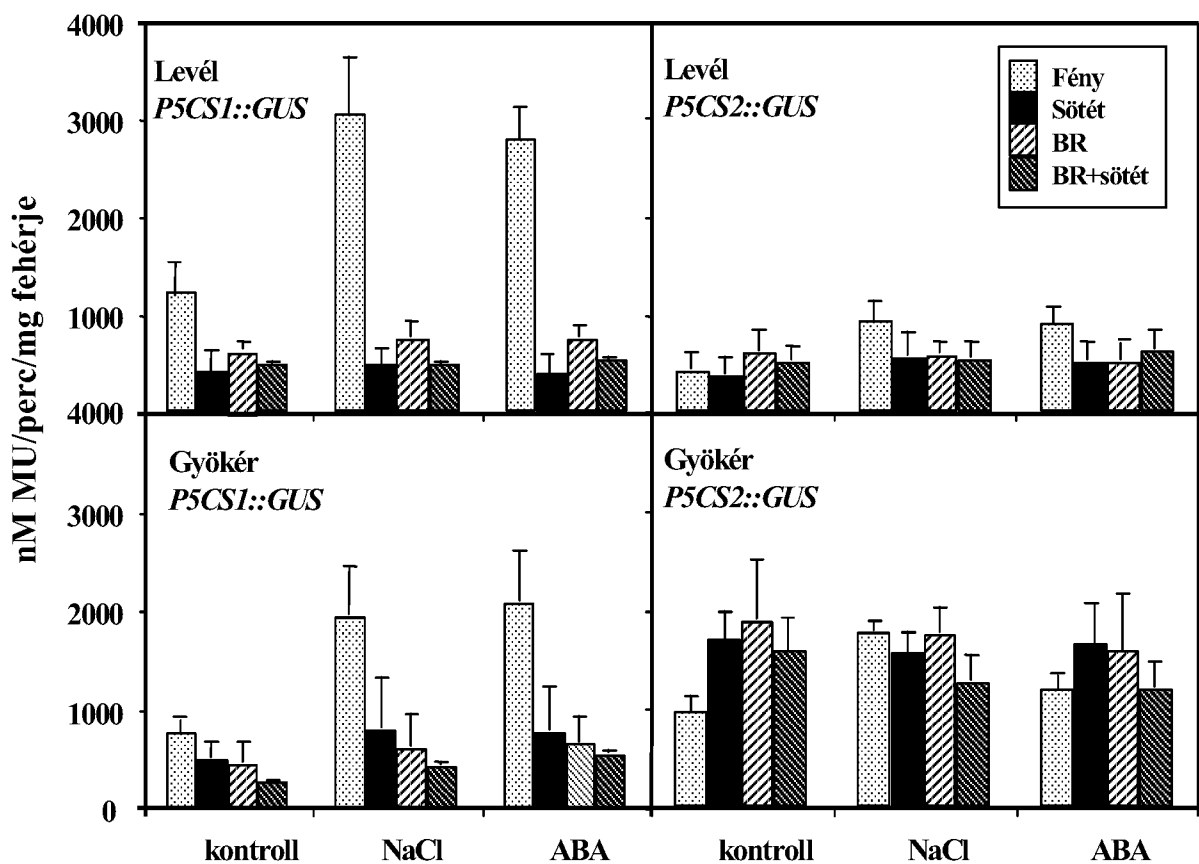
Az *AtP5CS2* promóter aktivitása 3 napos csíranövények esetében a gyökerek hipokotil felé eső részében volt megfigyelhető. 7 napos csíranövényeknél kismértékben a hipokotilban, valamint a gyökerekben látszott festődés. Az oldalgyökerek eredése jól láthatóan festődött. Üvegházi növényeknél pedig a gyökerek megnyúlási zónájában, az oldalgyökerek kezdeményeiben, valamint kismértékben a csészelevelekben láttunk expressziót. A 10 μ M ABA-kezelés hatására az *AtP5CS1* promóterhez hasonlóan az *AtP5CS2* promóter esetében is csak a promóteraktivitás erőssége változott, a térbeli eloszlása nem.

5.4.3. *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók tanulmányozása fluorimetriás enzimaktivitás meghatározással

Az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók tanulmányozása vad típusú növényben

Annak igazolására, hogy a NaCl-, ABA-, sötét-, valamint epibrassinolid-kezelések hatására az *AtP5CS* génnek mRNS szintjében bekövetkező változások valóban a transzkripció változásából, és nem az mRNS eltérő stabilitásából származnak, az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat hordozó génmódosított vad típusú (*Col-1*) csíranövényeket használtuk. 3 hétig fényben nőtt növények egy részét fényben kezeltünk 24 h-n át 200 mM NaCl-dal, illetve 10 μ M ABA-val. A növények második csoportját 3 nap sötétadatáció után kezeltük a fentebb leírt módon (sötétben), a harmadik részt 3 nap 0.1 μ M 24-epibrassinolid-előkezelés után fényben (epibrassinolid jelenlétében), a negyedik csoportot pedig kombinált epibrassinolid + sötét-előkezelés után (epibrassinolid jelenlétében, sötétben). A kezeléseket követően a növények levelében és gyökerében elkülönítve mértük a GUS enzimaktivitást. Mérési eredményeink a 14. ábrán láthatóak.

Fényen nőtt kontroll *AtP5CS1::GUS* riporter konstrukciót hordozó növények leveleiben kb. háromszor magasabb enzimaktivitást mértünk, mint a sötétadaptált növények leveleiben. A sötétkezelés kb. 50 %-os csökkenést okozott a gyökerek alapszintű enzimaktivitásában. 200 mM NaCl levelekben kb. háromszoros, míg 10 μ M ABA kb. 2.5-szeres indukciót okozott. 3 nap sötétadaptáció után ez az indukálhatóság megszűnt. Fényben nevelt növények gyökereiben NaCl és ABA hatására kb. 3-szoros indukciót tapasztaltunk, melyet szinte teljesen megakadályoz a sötétadaptáció. A fényen tartott növények leveleiben és gyökereiben az ABA- és a sókezelés hatására bekövetkező P5CS1-GUS enzimaktivitás emelkedése a sötétadaptációhoz hasonlóan brassinolid előkezeléssel is gátolható volt.



14. ábra Sötétadaptáció és brassinolid előkezelés hatása az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók működésére.

3 hétig fényben növesztett vad típusú (*Col-1*) *Arabidopsis* csíranövények levelében és gyökerében mérhető *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* enzimaktivitás sötétadaptációt vagy brassinolid-előkezelést, illetve a kombinált előkezelést követő 24 h-n át tartó 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-indukciót követően.

Az *AtP5CS2::GUS* riporter konstrukciót hordozó növények leveleiben mért alapaktivitás kb. harmada az *AtP5CS1::GUS* génkonstrukció esetében mért értéknek. Ezt az alapaktivitást a sötétadaptáció nem befolyásolta. A fényen tartott növények esetében az alapaktivitás kb. kétszeresére nőtt NaCl-, illetve ABA-kezelés hatására. A 3 nap sötétadaptációt követően a fent említett kezelésekkel kiváltott indukció mértéke csökkent a levelekben. A gyökerekben az *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukció aktivitása kb. kétszeresére növelhető 200 mM NaCl-kezeléssel, míg a 10 μ M ABA-kezelés hatása kevésbé kifejezett. Sötétadaptációt követően a gyökerekben mért alapaktivitás kb. kétszeresére nőtt, melyet sem NaCl-dal, sem ABA-val nem lehetett indukálni. Ez egybeesik azzal a megfigyeléssel, hogy hasonló kísérleti elrendezés mellett a *P5CS2* mRNS szintjének kismértékű emelkedését tapasztaltuk (ld. 11. ábrát). A brasszinolid nem változtatta meg a *P5CS2*-GUS alapaktivitását a hajtásokban, de gátolta az ABA- és sóindukciót. A sötétkezeléshez hasonlóan a BR előkezelés a fényben, illetve sötétben tartott növények gyökereiben is kétszeresére növelte a *P5CS2*-GUS alapaktivitást, amely sóval és ABA-val nem volt indukálható.

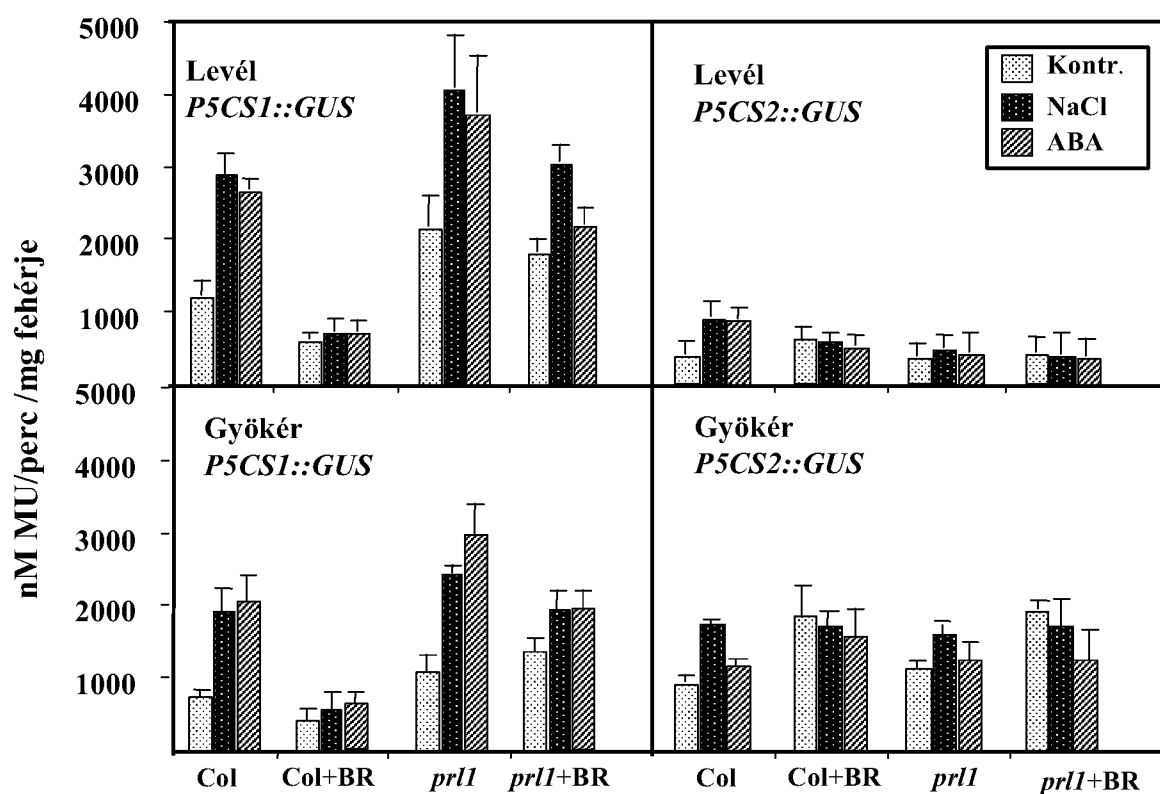
A *prl1* mutáció hatása az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók működésére

Az 5.3.7. pontban leírt Northern hibridizáció eredményének megerősítésére az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók működését *prl1* mutáns háttérben vizsgáltuk. A növények gyökerében és levelében elkülönítve mértük a GUS enzimaktivitást. Mérési eredményeink a 15. ábrán láthatóak.

A vad típusú (*Col*) háttérrel összehasonlítva 1.5-2-szer magasabb GUS enzimaktivitást mértünk az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukciót hordozó *prl1* mutáns levelében és gyökerében 24 h-n át tartó 10 μ M ABA, illetve 150 mM NaCl kezelés után. A vad típusú növényekben mérhető enzimaktivitás a 0.1 μ M epi-brasszinoliddal való előkezelést követő ABA-, illetve NaCl-kezelés után jelentős mértékben csökkent. A *prl1* mutánsban ez a csökkenés kisebb mértékű.

Az *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciót hordozó *prl1* mutáns leveleiben a vad típushoz képest kisebb enzimaktivitás mérhető (alapállapotban, illetve különböző kezelések után is), melyen a BR gátló hatása nem érvényesül. A vad típusú és a mutáns növény

gyökereiben hasonló enzimaktivitások mérhetőek alapállapotban, illetve a NaCl- és ABA-kezelést követően. A BR kezelés a vad típushoz hasonlóan a *prl1* mutáns gyökereiben is az alapállapotú *AtP5CS2* aktivitást megnöveli, amely az alkalmazott kezelésekkel nem növelhető tovább.



15. ábra A *prl1* mutáció hatása az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciók működésére.

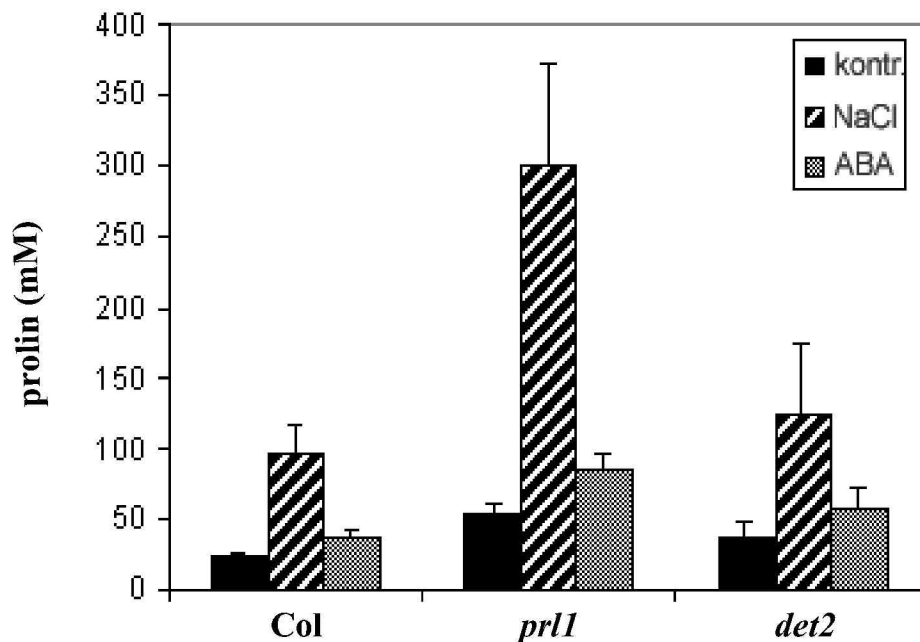
Az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat hordozó vad típusú (*Col-1*) és *prl1* növények levelében és gyökerében meghatározott GUS enzimaktivitás 3 nap 0.1 μ M 24-epibrassinolid-előkezelést követő, illetve annak hiányában elvégzett 24 h-n át tartó 200 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezelést követően.

5.5. Az emelkedett *AtP5CS1* transzkripció hatása a növények szabad prolin szintjére

Megvizsgáltuk, vajon a *prl1* és *det2* mutánsokban megfigyelt emelkedett szintű *AtP5CS1* transzkripció hatása megjelenik-e a szabad prolin szintjében is. A kísérletben 3

hetes vad típusú, *prl1* és *det2* csíranövényeket 150 mM NaCl-dal ill. 10 μ M ABA-val kezeltünk. A kezelés időtartama 24 h volt. A mérési eredmények a 16. ábrán láthatóak.

A kontroll vad típusú növények kb. 15 mM szabad prolint tartalmaztak, amely ABA-kezeléssel kb. a kétszeresére, míg NaCl-kezeléssel ötszörösére emelkedett. A kezeletlen *det2* növények szabad prolin szintje kb. 30 mM volt, ami ABA-kezeléssel kétszeresére, NaCl-kezeléssel pedig ötszörösére emelkedett. A *prl1* mutánsban az alap prolin szint közel 50 mM volt. Ez az érték kétszeresére emelkedett ABA-kezelést követően, NaCl-kezelés után pedig elérte a 300 mM-t. Tehát az *AtP5CS1* expressziójának változása megjelenik a szabad prolin szintjében is mind az ABA-túlérzékeny *prl1*, mind pedig a brassinoszteroid-hiányos *det2* mutánsban.



16. ábra Az emelkedett *AtP5CS1* transzkripció hatása a prolin felhalmozódásra.

24 h-n át tartó 150 mM NaCl-, illetve 10 μ M ABA-kezelés hatása 3 hetes vad típusú (Col), *prl1* és *det2* mutánsok szabad prolin szintjére.

6. Eredmények értékelése

6.1. Környezeti faktorok és hormonok hatása a prolin felhalmozódásra

A magasabbrendű növényekben gyakran prolin halmozódik fel a szárazság-, illetve sóstressznek kitett növényekben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy vad típusú *Arabidopsis*-ban a NaCl-, glükóz-, illetve mannitol-kezelés jelentős emelkedést idézett elő a szabad prolin szintjében, míg a hidegkezelésnek alig volt hatása (3.(a) ábra). Verbruggen és mtsai (1993), valamint Hayashi és mtsai (2000) is a szabad prolin szint jelentős emelkedéséről számoltak be NaCl-kezelés hatására. A 24 h-n át tartó hidegkezelés csekély mértékben emelte meg a szabad prolin szintjét 3 hetes csíranövényekben. Azonban Savouré és mtsai 1997-ben megjelent közleménye szerint a hidegkezelés kb. kétszeresére emelte a szabad prolin szintjét 10 napos csíranövényekben. Az ellentmondó eredmények magyarázata a felhasznált növények eltérő életkora lehet.

Számos ozmotikus stressz által indukált gén a táptalajhoz külsőleg hozzáadott ABA-val is aktiválható (összefoglaló: Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Kísérleteink során megállapítottuk, hogy sem az auxin (2,4-D), sem a citokinin (IPAR) kezelésnek nem volt számottevő hatása a szabad prolin szintjére. Azonban ABA-kezelést követően a prolin szintje jelentősen megemelkedett (3.(b) ábra).

Megállapítottuk, hogy a fény esszenciális a NaCl-, , illetve a külsőleg alkalmazott ABA-kezelés során létrejövő prolin felhalmozódásban. Néhány napig tartó sötétadaptációt követően sem a NaCl, sem az ABA nem tudta kiváltani a prolin felhalmozódást (3.(c) ábra). Ez arra utal, hogy az ABA-közvetítette stressz-jelátvitelhez szükség van a fény jelátvitelben szereplő komponensekre. A fénynek az ozmotikus stressz során létrejövő prolin felhalmozódásra gyakorolt pozitív hatásáról számos közleményben lehet olvasni (Goas és mtsai, 1982; Joyce és mtsai, 1984; Sanada és mtsai, 1995, Hayashi és mtsai, 2000).

6.2. P5CS gének klónozása, szekvencia analízise és térképezése

Munkánk kezdetekor még nem volt ismert *Arabidopsis thaliana*-ban a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló kétfunkciós enzimet kódoló gén. Csoportunknak Dr. Koncz Csaba kölni munkacsoportjával kooperációban sikerült csíranövényekből készített cDNS könyvtár szűrésével izolálni az *AtP5CS1* gént, amely

azonosnak bizonyult a közben Yoshiba és mtsai (1995), valamint Savouré és mtsai (1995) által izolált *P5CS* génnel. Továbbá sejtszuspenziós kultúrából sikerült izolálni egy másik, *AtP5CS2*-nek elnevezett gént. A szekvencia analízis (4. és 5.(a) ábrák) és a Southern hibridizáció (5.(c) ábra) alapján elmondhatjuk, hogy az időközben megjelent irodalmi adatokkal (Yoshiba és mtsai, 1995; Savouré és mtsai, 1995) ellentétben *Arabidopsis thaliana*-ban két gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló kétfunkciós enzimet. Az aminosavak bioszintéziséhez vezető biokémiai folyamatokban szereplő enzimeket kódoló gének redundanciája nemcsak *Arabidopsis*-ban, hanem lucernában (*Medicago sativa*; Ginzberg és mtsai, 1998) és paradicsomban (*Lycopersicon esculentum*; Fujita és mtsai, 1998) is megfigyelhető. Az evolúció során a géncsaládok tagjai gyakran a transzkripcionális szintű szabályozásban bekövetkező változások miatt rendelkeznek eltérő biokémiai funkcióval.

Munkánk ezen szakaszában még nem volt ismert az *A. thaliana* teljes nukleotidsorrendje, ezért YAC klónok felhasználásával sikerült az *AtP5CS1* gén térképpozícióját pontosítani, az *AtP5CS2* gén pozícióját pedig meghatározni (5.(b) ábra). Napjainkban, az *Arabidopsis thaliana* teljes nukleotidsorrendjének ismertté válásával egyszerűbbé vált egy adott gén izolálása (polimeráz láncreakció segítségével), valamint adatbankokban számos hasznos adat található a gének exon-intron szerkezetéről, az általuk kódolt fehérjék konzervált doménjeiről. A www.arabidopsis.org honlapon az *AtP5CS1* gént At2g39800 azonosító számmal találhatjuk meg az *A. thaliana* 2. kromoszómáján. Az *AtP5CS2* gén azonosítója pedig az At3g55610, és a 3. kromoszómán található. A honlapon megtalálható mindkét *AtP5CS* gén exon-intron szerkezete, mely azonosnak bizonyult az általunk is meghatározott génstruktúrával. Rekombináns beltenyésztett vonalak felhasználásával 1998-ban elvégzett térképezés szerint az *AtP5CS1* gén a 2. kromoszóma 69.04 cM helyére, az *AtP5CS2* gén pedig a 3. kromoszóma 68.53 cM helyére térképeződött (www.arabidopsis.org).

6.3. Az *AtP5CS* gének szövetspecifikus expressziójának vizsgálata

A szövetspecifikus génkifejeződés vizsgálata is megerősítette a Southern hibridizációval kapott eredményeket, mely szerint *Arabidopsis*-ban két gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló enzimet. Ez a két gén eltérő szövetspecifitással működik. A génspecifikus próbával elvégzett Northern hibridizációval

kimutattuk az *AtP5CS1* mRNS-t a legtöbb növényi szervben (6. ábra). Savouré és mtsai (1995) hasonló *AtP5CS1* szövetspecifikus génkifejeződésről számoltak be, hibridizáláshoz az *AtP5CS1* cDNS-t felhasználva. Jól detektálható mennyiségű transzkript van a virágból izolált össz RNS-ben (5. ábra), valamint az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukció működését is kimutattuk GUS hisztokémiai analízissel (13. ábra). Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a prolin szintézis és lebontás fontos a virágzásban és a magképződésben (Verbruggen és mtsai 1996). Továbbá ismert, hogy az egyik prolin transzportert kódoló gén, a *ProT1* legerősebben a virágban expresszálódik és a megtermékenyülés után csökken az expressziója. Só-, illetve vízstressz nem befolyásolta a *ProT1* kifejeződését (Rentsch és mtsai, 1996).

Az *AtP5CS2* gén esetében a legtöbb növényi szerv esetében ki tudtuk mutatni az mRNS-t Northern hibridizációval, de mennyisége sokkal kisebb, mint az *AtP5CS1* gén esetében. Azonban az aktívan osztódó sejteket tartalmazó kísérleti rendszerekben az *AtP5CS2* gén mRNS-ének mennyisége nagy, míg a másik gén esetében nincs detektálható mennyiségű transzkript. Ezzel magyarázható, hogy Savouré és mtsai (1995), valamint Yoshida és mtsai (1995) csak egy *AtP5CS* génről számoltak be, ugyanis mindkét csoport csak *Arabidopsis* csíranövényből készített cDNS-könyvtár szűrését végezte. Szövetspecifikus eltérés létezhet a két *AtP5CS* gén mRNS-ének érési folyamatában vagy a transzkript stabilitásában, ugyanis a csíranövényből készített cDNS könyvtárból csak *AtP5CS1*-t kódoló cDNS-t sikerült izolálni, noha detektálható mennyiségű *AtP5CS2* mRNS van a különböző növényi szervekben.

6.4. Környezeti faktorok hatása az *AtP5CS* gének expressziójára

A prolin bioszintézis két kulcsenzimét (P5CS, P5CR) kódoló gének működését részletesen tanulmányozták *Vigna aconitifolia*-ban és *Arabidopsis*-ban (Hu és mtsai, 1992; Verbruggen és mtsai, 1993; Yoshida és mtsai, 1995; Savouré és mtsai, 1995). 1995-ben Yoshida és mtsai arról számoltak be, hogy NaCl és kiszáritás hatására *Arabidopsis* csíranövényekben gyors emelkedés figyelhető meg az *AtP5CS1* mRNS szintjében. Eredményeink szerint az *AtP5CS1* mRNS szintje valóban gyorsan és nagymértékben megemelkedik a fent említett kezelések hatására (7. ábra). A Northern hibridizáció során kapott eredményt megerősítette az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukciót hordozó vad típusú (Col-1) növények analízise is (14. ábra). Az *AtP5CS2* gén indukciója pedig lassúbb és kisebb mértékű (7. és 14. ábra). Verbruggen és mtsai (1993) beszámoltak a prolin

bioszintézisében az *AtP5CS* mellett szereplő *AtP5CR*-t kódoló gén mRNS szintjének emelkedéséről NaCl-kezelés során. Azonban a *P5CR* gén indukciója sokkal alacsonyabb volt, mint a *P5CS* gén esetében. Yoshiba és mtsai (1995) szerint az *AtP5CR*-t kódoló gén expresszióját a vízhiány, a sóstressz és az ABA-kezelés nem befolyásolta szignifikáns mértékben. A növények dehidratációja, majd az azt követő rehidratáció során a prolin mennyiségének változása arányos volt a *P5CS* gén mRNS szintjének változásával (dehidratáció során emelkedett, rehidratáció során pedig csökkent, Yoshiba és mtsai, 1997). Ezen adatok arra utalnak, hogy ozmotikus stressz során az *AtP5CS* gén jelentősebb szerepet játszik a prolin felhalmozódásban, mint az *AtP5CR* gén.

6.5. Hormonok hatása az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* génekre

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy sem az auxin (2,4-D), sem a citokinin (IPAR) kezelésnek nem volt számottevő hatása a szabad prolin szintjére, azonban ABA-kezelést követően jelentősen megemelkedett (3.(b) ábra) Ezen eredményeink alátámasztására elvégzett Northern hibridizáció azt mutatta, hogy sem az auxin, sem a citokinin kezelés nem okozott jelentős mértékű változást a *P5CS* gének steady state mRNS szintjében (8. ábra). Az ABA-kezelés viszont az általunk vizsgált összes kísérleti rendszerben jelentős mértékben indukálta az *AtP5CS1* gént, míg az *AtP5CS2* génre kisebb hatást gyakorolt (8. ábra). Az ABA *AtP5CS* génekre gyakorolt hatását megerősítette az *AtP5CS1::GUS* és *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat hordozó vad típusú (Col-1) növények vizsgálata is (14. ábra). 1995-ben Yoshiba és mtsai is arról számoltak be, hogy 1mM ABA-kezelés hatására már 2h elteltével jelentős emelkedés figyelhető meg az *AtP5CS* mRNS szintjében, míg az említett kezelésnek nincs hatása az *AtP5CR* gén steady state mRNS szintjére. *Arabidopsis*-ban a vízhiány fellépését követően 2h elteltével detektálható az endogén ABA mennyiségének emelkedése, mely 10h elteltével eléri maximumát (Kiyoshue és mtsai, 1994). Úgy tűnik, a vízhiány indukálja az ABA-szintézist, és a megnövekedett mennyiségű ABA aktiválja a prolin bioszintézis kulcsenzimét kódoló géneket.

Korábbi irodalmi adatok szerint *Arabidopsis* csíranövényekben az *AtP5CS* mRNS felhalmozódás gyors emelkedést mutatott ABA-, illetve NaCl-kezelés hatására (Yoshiba és mtsai, 1995). A génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizáció a két *AtP5CS* gén mRNS felhalmozódása esetében jellegzetes szövetspecifikus eltéréseket tárt fel NaCl-, ABA- és auxin-kezelés hatására. A legnagyobb eltérés a sejtszuspenziós kultúra esetében figyelhető

meg. Az indukciós kezelések hiányában csak az *AtP5CS2* mRNS-t sikerült detektálni, melynek mennyisége a kezelések hatására jelentős mértékben emelkedett. Az *AtP5CS1* gén NaCl-, illetve ABA-kezelésre bekövetkező indukciója ebben a kísérleti rendszerben csupán 10-15 %-a az *AtP5CS2* indukciójának, az ABA hozzáadása után 1 h elteltével elérte maximumát, 6 h múlva elkezdett csökkenni és 48 h elteltével az alapértékre tért vissza. A NaCl-kezelés hatására mindkét gén 6 h elteltével indukálódik és ez a hatás 48 h múlva is fennáll. Ez azt jelzi, hogy egy ABA-által közvetített korai válasz szükséges az *AtP5CS* gének NaCl-indukciójához sejtszuszpenzióban.

6.6. Az ABA bioszintézisét, valamint a hormon érzékenységet érintő mutációk hatása az *AtP5CS* génekre

Az abszcizinsav ozmotikus stressz során létrejövő prolin felhalmozásban betöltött szerepének további vizsgálata során olyan *Arabidopsis* mutánsokat használtunk fel, melyekben a mutáció az ABA bioszintézist, illetve a hormon-érzékenységet érintette.

Az *aba1* mutáns tanulmányozása során Savouré és mtsai (1997) arra a következtetésre jutottak, hogy NaCl-kezelés hatására az *AtP5CS1* mRNS-szintjének emelkedése nem függ a növényekben található ABA mennyiségétől, ez ugyanis az *aba1* mutánsban is megfigyelhető. Továbbá a mutáns növényekben is emelkedik a szabad prolin szintje NaCl-kezelés hatására, bár kisebb mértékben, mint a vad típusú növényben. Az *aba1* mutáns esetében az általunk kapott kísérleti eredmények (9. ábra) némileg ellentmondanak a Savouré és mtsai (1997) által közölt adatoknak. Northern hibridizációval kapott eredményeink szerint az *aba1* mutánsban nem jön létre a NaCl-kezelés okozta korai fázisú *AtP5CS1* mRNS felhalmozódás. Tehát ezen gén só-okozta aktiválódását egy ABA-közvetítette korai transzkripcionális válasz befolyásolja. Mivel az *aba1* mutánsban az *AtP5CS2* gén aktiválódása sem detektálható, ezért valószínűleg az ABA-nak szerepe van a NaCl-indukció lassúbb szakaszában is. Az ellentmondó eredmények magyarázata a kísérleti körülmények eltérése lehet. Savouré és mtsai 10 napos Landsberg erecta ökotípusú csíranövényeket 24 h-n át 250 mM NaCl-dal kezelt. Mi pedig 14 napos Columbia ökotípusú csíranövényeket 6 h-n át 200 mM NaCl-dal kezeltünk.

NaCl-kezelés hiányában az *abi1* *Arabidopsis* mutáns esetében mindkét *AtP5CS* gén mRNS szintje a vad típushoz képest alacsonyabb (9. ábra). Ez arra utal, hogy az *AtP5CS* gének alapszintű transzkripciójának mértéke az ABI1 által érintett jelátviteli út befolyása alatt

állhat. Ezen jelátviteli út *P5CS* expresszióra gyakorolt hatása NaCl-kezelés során azonban nem abszolút kizárólagos, mivel bizonyos mennyiségű transzkriptumot mindkét gén esetében ki tudunk mutatni. Meglepő módon Savouré és mtsai (1997) kismértékű indukciót tapasztaltak az *AtP5CS1* gén esetében a nem-stresszkezelt *abi1* mutánsoknál. Az ellentmondó eredmények magyarázata nem ismert.

Az *axr2 Arabidopsis* mutánsban a 6 h NaCl-indukciót követően mindkét *AtP5CS* gén steady state mRNS szintje alacsonyabb, mint a vad típusban, viszont stresszkezelés nélkül hasonló a vad típushoz. (9. ábra). A jelenség magyarázatát nehezíti az a tény, hogy az *axr2* mutánsok az auxinon kívül ABA-ra és etilénre is rezisztensek (Estelle és Klee, 1984). Az *abi1*-hez hasonlóan valószínűleg az *axr2* mutáció is egy általános jelátviteli utat érint, az ABA érzékelés utáni valamely lépés sérült, melyet az *abi2* és *abi3* mutációk nem érintenek.

6.7. Fehérjeszintézis gátlásának hatása

Korábbi adatok szerint némely ABA-érzékeny gén, pl. a *RAB16A* ABA-indukciója lezajlik a fehérjeszintézis gátlásakor is, míg más géneknél ezt a folyamatot a cikloheximid gátolja (Mundy és Chua, 1988). *Arabidopsis*-ban és árpaiban (*Hordeum vulgare*) a NaCl- és ABA-indukálta prolin felhalmozódás cikloheximiddel gátolható (Stewart és mtsai, 1986; Verbruggen és mtsai, 1993). Az viszont nem volt ismert, ez vajon a *P5CR* és/ vagy *P5CS* mRNS-ek szintézisének vagy transzlációjának gátlásából származik-e. Az *AtP5CS* gén transzkripciójának emelkedése NaCl-kezelt *Arabidopsis* csíranövényben exponenciális görbe szerint történik (Yoshida és mtsai, 1995). Kísérleti eredményeink szerint az indukció gyors, lineáris szakasza, melynek eredményeképpen az mRNS szintje 4-5-szörösére emelkedik, nem függ a cikloheximidtől, tehát egy azonnali, korai választ jelent (10. ábra). NaCl-kezelt csíranövényekben ez a korai válasz elsődlegesen az *AtP5CS1* gén aktiválódásából származik. Ezen korai fázisban az *AtP5CS2* gén csak kisebb mértékű aktiválódást mutat. A *P5CS* mRNS szint a NaCl hozzáadását követően 6 h elteltével eléri maximumát. A só-indukció ezen második, lassúbb szakaszának létrejötte cikloheximid-előkezeléssel megakadályozható, tehát a *de novo* fehérjeszintézisnek szerepe van mindkét gén NaCl okozta indukciójának fenntartásában.

6.8. Sötétadaptáció hatása

A különböző környezeti faktorok prolin felhalmozódásra gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a fény esszenciális szerepet játszik a folyamatban (3.(c) ábra). Ezen eredmény megerősítésére génspecifikus próbákkal elvégzett Northern hibridizációval megállapítottuk, hogy a fény kulcsfontosságú a NaCl-, illetve a külsőleg alkalmazott ABA-kezelés során létrejövő magas szintű *AtP5CS1* kifejeződésében (11. ábra). Három napig tartó sötétadaptációt követően sem a NaCl, sem az ABA nem tudta kiváltani az *AtP5CS1* indukcióját. Ez arra utal, hogy az ABA-közvetítette stressz-jelátvitelhez szükség van a fény jelátvitelben szereplő komponensekre. Hasonló következtetést vonhatunk le az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukciót hordozó vad típusú *Arabidopsis* csíranövények GUS enzimaktivitásának meghatározásából is (14. ábra). Számos közleményben lehet olvasni a fényben, illetve a sötétben létrejövő prolin felhalmozódásról. Goas és mtsai (1982) megfigyelték, hogy az *Aster tripolium* növényekben NaCl-kezelést követően felhalmozódó prolin mennyisége fényben nagyobb, mint a sötétben. Sanada és mtsai (1995) szerint a NaCl-kezelés során a halofita *Mesembryanthemum cristallinum*, illetve a glikofita búza (*Triticum aestivum* L.) és árpa (*Hordeum vulgare*) növényekben a felhalmozódó prolin mennyisége fény-sötét váltakozást mutat. Továbbá megállapították, hogy a búza és árpa növények szárában található prolin mennyisége is oszcillál, tehát a fényben a levelekben képződő prolin nem szállítódik el más szervekbe a sötétperiódus alatt. Ez arra utal, hogy ozmotikus stressz során a fényben képződő prolin nemcsak ozmolitként szerepel, hanem a sötétperiódus során szubsztánként szolgálhat a légzési folyamatban és a képződő energia az ionok kompartmentalizációjához szükséges. Hayashi és mtsai (2000) beszámoltak az *Arabidopsis* levelekben fény/ sötét ciklus alatt megfigyelhető prolin szint, illetve *P5CS* és *PDH* gének mRNS-ének az oszcillálásáról. Ez az oszcilláció megfigyelhető NaCl-kezelés alatt, illetve a stressz hiányában is. A két gén által kódolt fehérje mennyisége is oszcillál és jól korrelál az mRNS mennyiségekkel. Az *AtP5CS2* gén aktivitása konstitutív jelleget mutat, mely stresszkezelés vagy fény által kevésbé befolyásolható. A *PDH* gén expressziója sötétkezelés hatására megemelkedik (stresszkezelés alatt, illetve annak hiányában is), így hozzájárul a sötétben bekövetkező prolin szint csökkenéshez. Az eredményekből kitűnik, hogy a fényben nőtt növényekben a sókezelés okozta prolinfelhalmozódásban a *P5CS1* indukciójával egyidejűleg a *PDH* kifejeződésének csökkenése játszik szerepet. Eredményeink megfelelnek a Peng és mtsai (1996) által megjelentetett közleményben szereplő adatoknak. Szerintük vízstressz során a *P5CS* gén indukálódik, míg a *PDH* gátlódik. A növények rehidratációja

pedig fordított irányú változásokat okoz. Tehát a prolin szintjét mind a *P5CS*, mind pedig a *PDH* gén kifejeződésének szintje szabályozza.

A fentiek alapján azt mondhatjuk, hogy a sötétkezelés só- és ABA-indukció által kiváltott prolinfelhalmozódásra gyakorolt gátló hatása a *P5CS1* mRNS szintjének csökkenése, és egyidejűleg a *PDH* mRNS szintjének növekedése miatt jön létre.

6.9. 24-epibrassinolid hatása

A fény sokoldalú szerepet tölt be a növényekben, és különböző jelátviteli utakon keresztül génexpressziós szintű változásokat okoz. Azon *Arabidopsis* mutánsokban, melyekben a brasszinoszteroid bioszintézis sérült, a fényindukált gének derepresszáltak (Szekeres és mtsai, 1996; Németh és mtsai, 1998). A külsőleg alkalmazott BR gátolja az *AtP5CS1* transzkripcióját mind stresszkezelés alatt, mind pedig annak hiányában, az *AtP5CS2* gén aktivitását pedig megnöveli a gyökerekben (12. ábra). A BR bioszintézisben sérült *det2* mutánsban (Li és mtsai, 1996) külsőleg alkalmazott ABA-kezelés hatására nagyobb mértékű *AtP5CS1* transzkripciót tapasztaltunk, ami ezen gén ABA-túlérzékenysége utal BR hiányában (12. ábra). Ezen emelkedett *AtP5CS1* expresszió hatására a vad típussal összehasonlítva a *det2* mutáns növényekben magasabb szabad prolin szintet mértünk (16. ábra). Eredményünk összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a BR-inszenzitív *Arabidopsis bri1* mutáns ABA-ra túlérzékeny (Clouse és mtsai, 1996). Tehát a BR hiánya, illetve a BR jelátviteli út sérülése ABA-túlérzékenységet okoz. Az ABA-közvetítette stressz jelátviteli út a BR negatív szabályozása alatt állhat. A BR gátolhatja azt a fény szignált, amely az *AtP5CS1* magas szintű, ABA-közvetítette expressziójához szükséges. Az *AtP5CS2* génkifejeződés fény-, illetve ozmotikus stressz által kevésbé befolyásolt, így BR által kevésbé gátolt expressziót mutat.

Napjainkban egyre több bizonyíték utal a sokféle környezeti hatásra adott különböző szintű növényi válaszreakciók létrejöttéhez vezető jelátviteli utak közötti kölcsönhatásra. A cukor és ABA jelátviteli folyamatok (Arenas-Huertero és mtsai, 2000), illetve a BR és az ún. "szénhidrát represszió" ("carbon catabolic repression": Salchert és mtsai, 1998) közötti kölcsönhatások ismeretében megvizsgáltuk a *P5CS* expressziót egy olyan *Arabidopsis* mutánsban (*prll1*: Németh és mtsai, 1998), ahol a cukor jelátviteli folyamatot is érintette a mutáció, valamint ABA-túlérzékenységet is okozott. Ebben a mutánsban emelkedett szintű *AtP5CS1* transzkripciót találtunk, melyet brasszínoliddal részlegesen gátolni lehetett. A

mutánsban észlelt magasabb szintű *AtP5CS1* expresszió a szabad prolin szintjében is megjelent (a *prl1* mutánsban a szabad prolin szintje magasabb, mint a vad típusban: 16. ábra). Az *AtP5CS2* génkifejeződést a *prl1* mutáció alig érintette. A *PRL1* gén számos fény-, illetve stressz-indukálható gén működésének negatív szabályozója, ezen gének a *prl1* mutánsban derepresszáltak. A *prl1* mutánsban a brassinoszteroid bioszintézisben szerepet játszó *CPD* gén expressziója csökkent mértékű, tehát a *PRL1* a BR bioszintézisnek pozitív szabályozója (Németh és mtsai, 1998). Ezért a *prl1* mutánsban észlelt magasabb szintű expresszió a csökkent mértékű BR bioszintézis következtében is létrejöhet, mivel azt ABA-túlérzékenység kíséri. A *prl1* mutánsok valóban ABA-túlérzékenyek (Németh és mtsai, 1998).

6.10. *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterek szekvencia analízise

Az 1. táblázatban láthatóak az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* promóterekben található feltételezett cisz-elemek. Mindkét *AtP5CS* gén promóterében megtalálható a CACGTG palindróm szekvencia, melyet ABRE elemnek hívnak (ABA-érzékeny elem). Az ebben előforduló ACGT mag az ún. G-box-ban is megtalálható. A G-box számos környezeti faktor által indukálható gén promóterében előfordul. Az ACGT mag körüli nukleotidok fontosak a DNS-fehérje kölcsönhatás specifikussá tételében. Mindkét *AtP5CS* promóterben számos feltételezett G-box található, de ezek funkciója még nem ismert. Az ABRE elemhez és a G-box-hoz is ún. bZIP transzkripciós faktorok kötődnek. A bZIP fehérjék tartalmaznak egy bázikus aminosavakban gazdag DNS-kötő és egy leucin zipzár dimerizációs domént. Choi és mtsai (2000) izolálták az ún. ABF (ABRE-kötő faktor: ABRE-binding factor) géncsalád tagjait. Ezen gének által kódolt fehérjék is a bZIP transzkripciós faktorok közé tartoznak és képesek élesztőben az ABRE-t tartalmazó riporter gént transzaktiválni. Valamint az ABF család tagjait kódoló gének expressziója ABA-kezelés és ozmotikus stressz hatására megemelkedik, tehát ezen transzkripciós faktorok részt vehetnek az ozmotikus stressz által befolyásolt gének aktiválásában. Még nem ismert, vajon milyen transzkripciós faktorok vesznek részt az *AtP5CS* gének ozmotikus stressz-, illetve ABA-indukciójában.

Mindkét *AtP5CS* gén promóterében számos feltételezett Myb-faktor kötő hely is található (ún. MRE: Myb Recognition Element: Myb felismerő elem; MBS: Myb Binding Site: Myb-kötő hely). A Myb transzkripciós faktorokban 3 nem tökéletes (imperfekt) ismétlődés található, amelyek egy helix-turn-helix motívumot képeznek. Mindhárom ismétlődésben 3 konzervált triptofán fordul elő 18-19 aminosavanként. Ez elősegíti

másodlagos szerkezetek kialakulását. A növényekben található Myb-szerű gének egy nagy családot alkotnak és számos funkciójuk lehet (Meissner és mtsai, 1999). A kiszáradás által indukált *Arabidopsis* AtMyb2-t az RD22 gén Elképzelhető, hogy az *Arabidopsis*-ből izolált AtMyb2 szabályozhatja az *AtP5CS1* gént, mivel a NaCl-túlérzékeny *sos1* mutánsban NaCl-kezelés hatására mind az *AtP5CS1*, mind pedig az *AtMyb2* expressziója magasabb, mint a vad típusban (Liu és Zhu, 1997).

Az *AtP5CS1* és *AtP5CS2* gének promótereiben az ún. DRE (Drought Responsive Element: vízhiányra érzékeny elem: TACCGACAT) elem magja (CCGAC) található meg. A DRE motívum számos, vízhiánnyal és hideg-kezeléssel indukálható gén promóterében is megtalálható. A DREB1A és DREB2A transzkripciós faktorok kötődnek a DRE motívumhoz és számos gén működését szabályozzák (Liu és mtsai, 1998). A CaMV 35S promóter mögé épített *DREB1A* cDNS-t hordozó transzgénikus növényekben a DREB1A célgénjeinek expressziója emelkedett, és megnövekedett ozmotikus stressztoleranciát mutattak. Stressz hiányában azonban növekedésük elmaradt a vad típusétól (Liu és mtsai, 1998). Kasuga és mtsai (1999) beszámoltak a stressz-indukálható RD29A promóter mögé épített *DREB1A* cDNS-t hordozó transzgénikus növények megnövekedett stressztoleranciájáról, valamint ezen növények optimális körülmények közötti normális növekedéséről. Ez a rendszer nagyon elegáns példa arra, hogy stressz-specifikus szabályozó elemek felhasználásával javítani lehet a növények ozmotikus stressz toleranciáját.

Megállapítottuk, hogy az *AtP5CS1* gén kifejeződését nagymértékben befolyásolja a fény (7., 11. és 14. ábrák). A gén promóterében megtalálhatóak G box (CACGTG), I box (GATAA) és GT-1 box (GGTTAA) konszenzus szekvenciák, melyek gyakran előfordulnak fény-indukált gének promótereiben. A három cisz-elem közül önmagában egyik sem elegendő, hogy egy nem-fényszabályozott gén működését fény-szabályozottá változtassa. Puente és mtsai (1996) szerint ezen elemek páronként történő előfordulása fény-szabályozott génkifejeződést biztosít. Még nem ismert, vajon mely cisz-elemek, illetve a hozzájuk kapcsolódó transzkripciós faktorok vesznek részt az *AtP5CS1* gén fény-szabályozott működésében. Az *AtP5CS2* gén promóterében nem található olyan szekvencia-elem, mely tökéletesen megegyezne a konzervált GT-1 box és I box szekvenciákkal. Ez lehet a magyarázata, hogy az *AtP5CS2* gén fény által kevésbé befolyásolt.

7. Összefoglalás

Csoportunk egyik fő érdeklődési területe az ozmotikus stresszválasz tanulmányozása *Arabidopsis thaliana*-ban. Ezért kezdtük tanulmányozni az egyik legjellegzetesebb stresszválaszban, a prolin felhalmozódásban szerepet játszó enzimeket kódoló gének működését és szabályozását.

Megállapítottuk, hogy *Arabidopsis thaliana* modellnövényben NaCl-, mannitol-, glükóz- és ABA-kezeléssel a szabad prolin szintje jelentősen emelhető, és ezen emelkedés sötétadaptációval megakadályozható.

Kimutattuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal ellentétben *Arabidopsis*-ban két gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló kétfunkciós enzimet, a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-szintetázt. Megállapítottuk, hogy ez a két gén különböző kromoszómán 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.

Génexpressziós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a két *AtP5CS* gén eltérő szövetspecifitást mutat. Az *AtP5CS1* mRNS a legtöbb szervben (gyökér, levél, szár, virág) megtalálható, míg a másik gén mRNS-ét főleg az aktívan osztódó sejtekben mutattuk ki (kallusz, sejtszuspenziós kultúra). Ezen eredményeinket megerősítette az *AtP5CS1::GUS*, illetve az *AtP5CS2::GUS* riporter génkonstrukciókat hordozó transzgénikus növények GUS hisztokémiai analízise is.

Mindkét *AtP5CS* gén indukálható kiszáritással, 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.

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 indukcióját jelenti) cikloheximiddel nem gátolható, és az *aba1* 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.

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 génnek 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* génnek alapállapotú, illetve NaCl-indukált működésében.

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.

Kimutattuk, hogy a sötétadaptációhoz hasonlóan a brasszínolid-előkezelés is megakadályozza az *AtP5CS1* gén NaCl-, illetve ABA-által kiváltott indukcióját fényben és sötétben is. A brasszínolid *AtP5CS2* gént gátló hatása csak levelekben érvényesül, a *PDH* génre nincs hatással.

Az ABA-túlérzékeny *pr11* mutánsban nagyobb az *AtP5CS1* transzkript szintje NaCl-, illetve ABA-kezelést követően, mint a vad típusban. A brasszínoszteroid-hiányos *det2* mutáns esetében is emelkedett szintű transzkripciót tapasztaltunk az ABA-kezelést követően. 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.

Megállapítottuk, hogy *pr11* mutáns háttérben a megnövekedett *AtP5CS1* transzkripcióhoz hasonlóan az *AtP5CS1::GUS* riporter génkonstrukció működése is emelkedett volt, melyet brasszínoliddal részlegesen gátolni lehetett. A *pr11* mutáció csekély változást okozott az *AtP5CS2::GUS* riporter konstrukció működésében.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal ellentétben két eltérő szövetspecititással és eltérő szabályozás alatt működő *P5CS* gén kódolja a prolin bioszintézis sebességmeghatározó lépését és ezen génnek transzkripcionális szintű szabályozása döntő mértékben befolyásolja az ozmotikus stressz során létrejövő prolin felhalmozódást.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Szabados Lászlónak és Dr. Koncz Csabának a munkám során nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítségért.

Munkám egy részét Kölnben, a Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Dr. Koncz Csaba által vezetett csoportjában végeztem. Ezúton szeretném megköszönni, hogy mindezt lehetővé tette.

Továbbá köszönettel tartozom Prof. Dudits Dénes és Dr. Vass Imre igazgató uraknak, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Megkülönböztetett hálával tartozom Nagy Rékának, Székely Gyöngyinek és Rigó Gábornak a munkám során nyújtott önzetlen segítségért. Köszönet illeti az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport minden tagját az évek során nyújtott támogatásért.

Köszönettel tartozom Dr. Páy Anikónak a hasznos kritikai észrevételeiért, amelyekkel hozzájárult a dolgozat elkészítéséhez.

Végezetül köszönettel tartozom családomnak, akik tanulmányaim során támogattak és elviselték az ezzel járó megpróbáltatásokat.

9. Irodalmi hivatkozások jegyzéke

Adams, E., Frank, L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1005-1061.

Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., León, P. (2000) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes. Dev.* 14: 2085-2096.

Babiychuk, E., Kushnir, S., Belles-Boix, E., Van Montagu, M., Inze, D. (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J Biol Chem.* 270(44):26224-26231.

Bates, L.S. (1973) Rapid determination of free proline content for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.

Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316: 1194-1199.

Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bako, L., Okresz, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., Koncz, C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(9):5322-5327.

Bogges, S.F., Steward, C.R., Aspinall, D., Paleg, L. (1976) Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol.* 58: 398-401.

Bowler, C., van Montague, M., Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.

Brady, S.M., Sarkar, S.F., Bonetta, D., McCourt, P. (2003) The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* (*ABI3*) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 67-75.

Bray, E.A. (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Bot.* 89: 803-811.

Briens, M., Larher, F. (1982) Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betains and free proline. *Plant Cell. Environ.* 5: 287-292.

Brown, A.D. (1990) Microbiol. Water Stress Physiology, Principles and Perspectives. New York: Wiley and Sons

Cayley, S., Lewis, B.A., Record, M.T.Jr. (1992) Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174: 1586-1595.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., Kim, S. (2000): ABFs: a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730.

Chory, J., Wu, D. (2001) Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol.* 125: 77-80.

Clouse, S.D., Langford, M., McMorris, T.C. (1996) A brassinosteroid insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* 111: 671-678.

Clouse, S.D., Sasse, J.M. (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427-451.

Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. és Roser, B. (1992): Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnol. (N Y)*, 10 (9) 1007-1011.

Creusot, F., Fouilloux, E., Dron, M., Lafleurriel, J., Picard, G., Billault, A., Le Paslier, D., Cohen, D., Chabouté, M.-E., Durr, A., Fleck, J., Gigot, C., Camilleri, C., Bellini, C., Caboche, M., Bouchez, D. (1995) The CIC library: a large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8: 763-770.

Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53: 121-127.

Delauney, A.J., Verma, D.P.S. (1990) A soybean gene encoding Δ^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, A.J., Verma, D.P.S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.

Delauney, A. J., Hu, C.-A. A., Kishor, P. B. K., Verma, D.P.S. (1993). Cloning of ornithine-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem*, 268(25):18673–18678.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D., Hama, H. (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126(2):759-769.

Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R., Krishna, P. (2002) Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.* 29(6):681-691.

Ecker, J. (1990) PFGE and YAC analysis of the *Arabidopsis* genome. *Methods* 1: 186-194.

Elthon, T.E., Stewart, C.R. (1981) Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.* 67:780-784.

Estelle, M., Klee, H.J. (1984) Auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* (szerk.: Meyerowitz, E.M., Somerville, C.) Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 555-578.

Farrás, R., Ferrando, A., Jásik, J., Kleinow, T., Ökrész, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., Koncz, C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 20: 2742-2756.

Finkelstein, R.R., Lynch, T.J. (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12(4):599-609.

Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F., Bartels, D. (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12(1):111-124.

Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R.A., Csonka, L.N. (1998) Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for Delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiol.* 118(2):661-674.

Galinski, E.A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.

Genoud, T., Métraux, J.P. (1999) Crosstalk in plant signaling: structure and function of the genetic network. *Trends Plant Sci.* 4: 503-507.

Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C., Zilberstein, A. (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Mol. Biol.* 38(5):755-764.

- Goas, G., Goas, M., Larher, F.** (1982) Accumulation of free proline and glycine betain in *Aster tripolium* subjected to a saline shock: a kinetic study related to light period. *Physiol. Plant.* 55: 383-388.
- Goddijn, O.J., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R.W., de Graaf, P.T., van Dun, K., Poels, J., Ponstein, A.S., Damm, B., Pen, J.** (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113(1):181-190.
- Goddijn, O.J., van Dun, K.** (1999) Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4(8):315-319.
- Gorham, J.** (1995) Betaines in higher plants: biosynthesis and role in stress metabolism. Amino acids and their derivatives in higher plants (szerk.: Wallsgrove, R.M.) Cambridge: Cambridge University Press, 173-203.
- Greenway, H., Munns, R.** (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Guan, L., Scandalios, J.G.** (1998) Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117: 217-224.
- Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.** (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80: 938-945.
- Hardie, D.G., Carling, D., Carlson, M.** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cells? *Ann. Rev. Biochem.* 67: 821-855.
- Hare, P.D., Cress, W.A.** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21:79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J.** (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50(333): 413-434.

- Harmon, A.C., Gribskov, M., Gubrium, E., Harper, J.F.** (2001) The CDPK superfamily of protein kinase. *New Phytol.* 151: 175-183.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J.** (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463–499.
- Hayashi, F., Ichino, T., Osanai, M., Wada, K.** (2000) Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expression in the light/ dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol.* 41(10): 1096-1101
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., Frommer, W.B.** (2000) Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 122: 357-367
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S.** (2000) Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122(4): 1129-1136.
- Hoyos, M.E., Zhang, S.** (2000) Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol.* 122 (4):1355-1363.
- Hsiao, T.C.** (1973) Plant responses to water stress. *Annual Rev. Plant Physiol.* 24: 519-570.
- Hu, C.-A.A., Delauney, A.J. and Verma, D.P.S.** (1992) A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9354-9358.
- Hua, X.J., van de Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N.** (1996) Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114(4):1215-1224.

- Hwang, I., Sze, H., Harper, J.F.** (2000) A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6224-6229.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K.** (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24(5):655-665.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Shinozaki, K.** (1997) Characterization of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol. Biol.* 33(5):857-865.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Wei, M., Zhu, J.K.** (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires myristoylation and calcium-binding. *Plant Cell* 12: 1667-1677.
- Iyer, S., Caplan, A.** (1998) Products of proline catabolism can induce osmotically induced genes in rice. *Plant Physiol.* 116: 203-211.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmor, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., Thomashow, M.F.** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jefferson, R.A.** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jones, M.M., Osmond, C.B., Turner, N.C.** (1980) Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit. *Austr. J. Plant Physiol.* 7: 193-205.
- Joyce, P.S., Paleg, L.G., Aspinall, D.** (1984) The requirement for low-intensity light in the accumulation of proline as a response to water deficit. *J. Exp. Bot.* 35: 209-218.

Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., Entian, K.D. (1996) Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Gen.* 252: 456-464.

Karakas, B., Ozias-Atkins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M., Reige, M. (1997) Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* 20: 609-616.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17: 287-291.

Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, A.-A.A., Verma, D.P.S. (1995) Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13(4):889-905.

Kiyosue, T., Yoshida, 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.

Knight, H., Knight, M.R. (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262-267.

Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J. (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. *Plant Molecular Biology Manual* (szerkesztők: Gelvin, G.B., Schilperoort, R.A.) B2: 1-22. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. Karssen, C.M. (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 61: 385-393.

Koornneef, M., Reuling, G., Karssen, C.M. (1984) The isolation and characterization of abscisic-acid-insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61: 377-383.

Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K.M., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 83-89.

Lansac, A.R., Sullivan, C.Y., Johnson, B.E. (1996) Accumulation of free proline in sorghum (*Sorghum bicolor*) pollen. *Can. J. Bot.* 74: 40-45

Lescot, M., Déhais, P., Moreau, Y., De Moor, B., Rouzé, P., Rombauts, S. (2002) *Nucleic Acid Res. Database* 30(1): 325-327.

Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chedror, F. és Giraudat, J. (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABII*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264(5164):1448-1452.

Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J. (1997) The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2* (*ABI2*) and *ABII* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9, 759-771.

Li, J., Chory, J. (1999) Brassinosteroid action in plants. *J. Exp. Bot.* 50: 275-282.

Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., Chory, J. (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272(5260):398-401.

Li, J., Biswas, M.G., Chao, A., Russell, D.W., Chory, J. (1997) Conservation of function between mammalian and plant steroid-5-alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(8):3554-3559.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391-1406.

Liu, J., Zhu, J.K. (1997) Proline accumulation and salt stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114: 591-596.

Liu, J., Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. 280(5371):1943-1945.

Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., Gruissem, W. (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* S389-S400

Mandava, N.B. (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52.

Mani, S., Van De Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128(1):73-83.

Matallana, E., Bell, C.J., Dunn, P.J., Lu, M., Ecker, J.R. (1992) Genetic and physical linkage of the *Arabidopsis* genome: Methods for anchoring Yeast Artificial Chromosomes. *Methods in Arabidopsis Research* (szerkesztő: Koncz, Cs., Chua, N.H., Schell, J.) Singapore: World Scientific Publishers, 144-169.

Mathur, J., Koncz, C., Szabados, L. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell. Rep.* 14: 221-226.

Maurel, C., Chrispeels, M.J. (2001) Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125: 135-138.

Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Bevan, M. (1999): Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* 11: 1827-1840.

Merlot, M., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* 25(3): 295-303.

Mikolajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszynska, G., Klessig, D.F., Dobrowolska, G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12(1):165-178.

Mundy, J., Chua, N.M. (1988) Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.

Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I. I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., Hirt, H. (1999) Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20(4):381-388.

Muraközy, E.P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A., Tuba, Z. (2003) Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *J Plant Physiol.* 160(4):395-401.

Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118(4):1233-1241.

Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., Naito, S. (1995) A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Develop.* 121: 629-636.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999a): Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18 (2) 185-193.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999b) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Let.* 461(3):205-210.

Németh, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kálmán, Zs., Stankovic-Stangelad, B., Bakó, L., Mathur, J., Ökrész, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Rédei, G.P., Schell, J., Koncz, Cs. (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD40 protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12: 3059-3073.

Papageorgiou, G.C., Murata, N. (1995): The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth. Res.* 25: 243-252.

Pawlowski, K., Kunze, R., De Vries, S., Bisseling, T. (1994) Isolation of total, poly(A) and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* D5: 1-13. *Kluwer Academic Publishers*

Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M., Schroeder, J.I. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* 9(3):409-423.

Peng, Z., Lu, Q., Verma, D.P.S. (1996) Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* 253: 334-341.

- Phang, J.M.** (1985) The regulatory functions of proline pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr. Top. Cell. Regul.* 25: 91-132.
- Pickett, F.B., Allison, K., Estelle, M.** (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462-1466.
- Puente, P., Wei, N., Deng, X.W.** (1996) Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15(14): 3732-3743
- Ramanjulu, S., Bartels, D.** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25(2):141-151.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W.B.** (1996) Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8(8):1437-1446.
- Rodriguez, P.L., Benning, G., Grill, E.** (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 421: 185-190.
- Roosens, N.H., Thu, T.T., Iskandar, H.M., Jacobs, M.** (1998) Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 117(1):263-271.
- Sakamoto, A., Murata, N.** (2001): The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiol.* 125(1): 180-188.
- Salchert, K., Bhalerao, R., Koncz-Kálmán, Zs., Koncz, Cs.** (1998) Control of cell elongation and stress responses by steroid hormones and carbon catabolic repression in plants. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* (1998) 353: 1517-1520.
- Sambrook, J., Fritsch, F.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanada, Y., Ueda, H., Kuribayashi, K., Andoh, T., Hayashi, F., Tamai, N., Wada, K. (1995) Novel light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum cristallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L., and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* 36: 965-970.

Sanchez, J.P., Chua, N.H. (2001) *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell.* 13(5):1143-1154.

Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.

Santarius, K.A (1992) Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiol. Plant.* 84: 87-93.

Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X.-J., Ardiles, W., Van Montague, M. (1995) Isolation, characterization and chromosomal location of a gene encoding the Δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 372:13-19.

Savouré, A., Hua, X.-J., Bertauche, N., van Montague, M., Verbruggen, N. (1997) Absciscic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses. *Mol. Gen. Gen.* 254: 104-109.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.

Sharp, R.E., Boyer, J.S., Nguyen, H.T., Hsiao, T.C. (1996) Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations. *Plant. Physiol.* 110: 1051-1053.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115(2):327-334.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3) 217-223.

Singh, P.K., Tewari, R.K. (2003) Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *J Environ Biol.* 24(1): 107-112.

Smeekens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.

Songstad, D.D., Duncan, D.R., Widholm, J.M. (1990) Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 41: 289-294.

Stewart, C.R., Voetberg, G., Rayapati, P.J. (1986) The effects of benzyladenine, cycloheximide, and cordycepin on wilting-induced abscisic acid and proline accumulations and abscisic acid- and salt-induced proline accumulation in barley leaves. *Plant Physiol.* 82: 703-707.

Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 94: 1035-1040.

Sun, C-W., Callis, J. (1997) Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *Plant J.* 11(5): 1017-1027

Szabados, L., Charrier, B., Kondorosi, A., de Bruijn, F.J., Ratet, P. (1995) New plant promoter and enhancer testing vectors. *Mol. Breed.* 1: 419-423.

Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C. (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85(2):171-182.

Tarzynski, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. (1993): Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.

Thomas, J.C., De Armond, R.L., Bohnert, H.J. (1992) Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol.* 98: 626-631.

Trewavas, A. (2000) Signal perception and transduction. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (szerkesztők: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.) American Society of Plant Physiologists.

Tripathi BN, Gaur JP. (2004) Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* DOI:10.1007/s00425-004-1237-2

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R. Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. Hirayama, T., Shinozaki, K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* function as an osmosensor. *Plant Cell*, 11: 1743-1754.

Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2000) Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Science*, 25, 67-74.

Verbruggen, N., Villarole, R., Van Montague, M. (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103: 771-781.

Verbruggen, N., Hua, X.-J., May, M. and Van Montagu, M. (1996) Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for negative transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8787–8791.

Voetberg, G.S., Sharp, R.E. (1991) Growth of maize primary root tip at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 96: 1125-1130.

Williamson, C.L., Slocum, R.D. (1992) Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ -1-pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 100:1464-1470.

Wilson, A.K., Pickett, F.B., Turner, J.C., Estelle, M. (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene, and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* 222: 377-383.

Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: S165 - 183.

Yamakawa, H., Mitsuhashi, I., Ito, N., Seo, S., Kamada, H., Ohashi, Y. (2001) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur. J. Biochem.* 268: 3916-3929

Yoshida, Y., Kiyoshue, 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 Δ -¹-pyrroline-5-carboxylate synthase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7: 751–760.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., Shinozaki, K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43(12):1473-1483.

Zhang, C. S., Lu, Q., Verma. D.P.S. (1995) Removal of feedback inhibition of Δ -1-pyrroline-5-carboxylate synthase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270: 20491–20496.

Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y-L., Wu, R. (1998) Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139: 41-48.

10. Ph.D. thesis

Background

Environmental factors that impose water-deficit stress, such as drought, salinity or extreme temperatures, place major limits on plant productivity. Upon exposure to osmotic stress, plants exhibit a wide range of responses at molecular, cellular and whole-plant levels. These include, for example morphological and developmental changes (e.g. shortening of life cycle, inhibition of shoot growth and enhancement of root growth), adjustment in ion transport and metabolic changes (e.g. carbon metabolism, the synthesis of compatible solutes). Under osmotic stress condition characteristic up- and down-regulation of gene expression can be observed. These transcriptional changes may be regulated directly by stress conditions or may result from secondary stresses and/or injury responses. A complex series of yet not clearly clarified signal transduction events lead to changing in gene expression pattern. One of the signals involved is abscisic acid (ABA).

Increased concentration of charged molecules in the cytosol may change the hydration sphere of macromolecules and thus affects their conformation or charge interactions. Compatible osmolytes can be important for maintaining the conformation of macromolecules. Osmolytes were originally thought to function mainly in osmotic adjustment by lowering cellular osmotic potential to facilitate water absorption and restore intracellular salt concentrations. Common osmolytes include sugars, polyols and amino acids or their derivatives. These compounds appear to have little interference in the function of macromolecules, even at very high concentrations.

Proline is one of the osmoprotective molecules which accumulates in many organisms, including bacteria, fungi, in vertebrates and plants in response to water stress and salinity. Genetic studies in prokaryotes demonstrate that proline is an essential compatible osmolyte because proline overproduction in bacteria confers acquired osmotic stress tolerance. In response to osmotic stress many higher plants accumulate proline which facilitates a correction of altered redox potential by replenishment of the NADP^+ supply. Furthermore proline is thought to function as free radical scavenger. Proline degradation can serve as carbon, nitrogen and energy source upon relief from stress. In higher plants proline can be synthesized either from glutamate or ornithine. The glutamate pathway is the dominant one under osmotic stress conditions. In the glutamate pathway the bifunctional Δ^1 -pyrroline-5-

carboxylate synthetase phosphorylates and reduces the glutamate to glutamyl-5-semialdehyde (GSA) which is spontaneously converted to pyrroline-5-carboxylate (P5C). P5C is reduced to proline by the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR). The rate limiting step is the γ -glutamyl kinase activity of the P5CS which is feed back regulated by proline. Degradation of proline takes place via oxydation to P5C by proline dehydrogenase (PDH) and subsequently to L-glutamic acid by P5C dehydrogenase. The proline accumulation during osmotic stress is the result of up-regulation of biosynthetic and down-regulation of degradation processes.

Aim of our study

At the beginning of our work the gene encoding P5CS was unknown in *Arabidopsis thaliana*, therefore our goals were:

- Isolation of *P5CS* gene(s)
- Mapping and sequence analysis of the *P5CS* gene(s)
- Gene expression study:
 - Tissue specificity
 - Stress inducibility
 - Hormonal regulation
 - „Crosstalk” with other factors
- Promoter analysis

Results and discussion

Since it was well known that proline accumulation during osmotic stress is very common plant response in adverse conditions, therefore we examined the effect of different environmental factors and hormones on proline accumulation in *A. thaliana*. We pointed out that 200 mM NaCl-, 200 mM glucose- and 200 mM mannitol-treatments increased the free proline level and cold treatment had little effect on it. Among hormones only the abscisic acid could significantly enhance the proline accumulation. In case of NaCl-, mannitol- and ABA-treatments similar results were reported previously. However, in contrast with previously published data, in our experimental system, cold (4°C) treatment failed to induce proline

accumulation. The reasons of the contradictory results are not known. The NaCl- and ABA-induced proline accumulation could be inhibited by days of dark adaptation. This result suggest that light plays pivotal role in proline accumulation in response to osmotic stress.

At the beginning of our work the regulation of gene coding for pyrroline-5-carboxylate synthetase in *A. thaliana* was unknown. In the frame of cooperation with Dr. Csaba Koncz's group in Cologne we could isolate the *AtP5CS1* cDNA (EMBL/Genebank X86777) from seedling derived cDNA library. It was identical with the meantime reported *P5CS* gene. Surprisingly, we could isolate a second, partial cDNA (*AtP5CS2*, EMBL/Genebank Y09355) from cell suspension culture-derived cDNA library. Dr. László Szabados and Dr. Nicolai Strizhov generated full length *AtP5CS2* cDNA using the 5'-RACE-PCR. In comparison with the *AtP5CS1* cDNA encoding the P5CS1 enzyme of 717 amino acids (77.7 kDa) the *AtP5CS2* cDNA consisted of 726 codons coding for the P5CS2 isoenzyme (78.8 kDa). The two *AtP5CS* cDNAs shared on overall identity of 82 %, yielding an amino acid similarity of 93 % between the two isoenzymes. The 5' and 3' non-coding regions of *AtP5CS* cDNAs displayed only 54 % and 53 % sequence identity, respectively providing useful gene specific probes. The multiple alignment analysis indicated the existence of conserved kinase and dehydrogenase domains, putative ATP and NADPH-binding sites, and leucine-rich region. Furthermore, two amino acid residues implicated in feed-back inhibition of the *Vigna* P5CS enzyme by proline are present in both *AtP5CS* sequences. Both *AtP5CS* genes were mapped to yeast artificial chromosome (YAC) clones using gene specific probes. In the case of *AtP5CS1* gene we could refine the previous mapping data (Savouré et al, 1995): this gene is located at position 78.5 cM of chromosome 2, in close proximity of the RFLP marker 05841. The position of *AtP5CS2* gene and corresponding YAC-contig was mapped by Dr. Csaba Koncz, by linkage analysis, using recombinant inbreds. The *AtP5CS2* gene was located close to position 101.3 cM of chromosome 3 marked by the RFLP marker m457. Both *AtP5CS* genes consist of 20 exon, and the comparison of the exon-intron structure indicated that the lengths of their exons are identical except for exon 20.

Northern hybridization with gene specific probes detected significant levels of *AtP5CS1* mRNA in roots, stem, leaves and flowers, as was observed earlier. In comparison, the levels of *AtP5CS2* mRNA were much lower in most plant organs. However, in actively dividing calli and cell suspension cultures the *AtP5CS1* transcript was undetectable, whereas the *AtP5CS2* mRNA represented an abundant transcript. Unknown tissue specific differences between processing or stability of *AtP5CS* mRNAs may exist. It can be the reason why it was

impossible to isolate *AtP5CS2* from seedling derived cDNA library although detectable amounts of *AtP5CS2* transcript could be found in most plant organs.

We performed Northern hybridization using the gene specific probes to study the effect of environmental and hormonal stimuli on transcriptional regulation of both *AtP5CS1* and *AtP5CS2* genes. The three days of dark adaptation decreased the *AtP5CS1* mRNA level with 40-50 %, but had no effect on *AtP5CS2* mRNA level. Both *AtP5CS* genes were induced by dehydration, NaCl- and ABA treatment, however the level and kinetics of the induction were different. Generally, the induction of *AtP5CS1* gene is faster and higher than the induction of the *AtP5CS2* gene. In cell suspension, ABA-induced increasing of both *AtP5CS* mRNA levels were observed earlier than in the case of NaCl-treatment which suggests that an early response mediated by ABA may be required for salt-induction of *AtP5CS* transcription.

The induction of *AtP5CS* mRNA synthesis in salt-treated *Arabidopsis* seedlings follows roughly an exponential curve. Our data (using Northern hybridization with gene specific probes) show that the fast linear phase of induction is not inhibited by cycloheximide, thus probably represents an immediate early response. The inhibition of protein synthesis by cycloheximide prevents the second, slower phase of salt-induction. The protein synthesis is probably required for continuous accumulation and maintenance of induced levels of *AtP5CS* mRNAs during salt stress.

NaCl-induced accumulation of *AtP5CS* mRNAs was monitored in mutant *Arabidopsis* lines where the mutations caused ABA-deficiency or ABA-insensitivity. In ABA-deficient *aba1-1* mutant, NaCl-treatment failed to induce any increase of *AtP5CS* transcript levels, demonstrating that ABA is absolutely essential as signaling molecule for salt-induced activation of *AtP5CS1* and *AtP5CS2* genes. Both *abi1-1* and *axr2* mutations reduced the *AtP5CS1* transcript levels to about half of the values detected in wild-type control seedlings following 1 and 6 h of salt induction. A similar effect of *abi1-1* and *axr2* mutations on the accumulation of *AtP5CS2* mRNA was detected only at 6 h. These data show that not only ABA biosynthesis, but also some steps in ABA (and possibly auxin) signalling, that are impaired in the *abi1-1* and *axr2* mutants, are implicated in the control of basic level and salt-induced accumulation of both *AtP5CS* transcripts in *Arabidopsis*.

We have found previously that proline accumulation is inhibited in dark-adapted plants suggesting that either light signaling, or indirectly a light-dependent metabolic or hormonal signaling pathway, plays a role in the control of proline metabolism. Analysis of steady-state transcript levels in light-grown and dark-adapted plants indicated that light is essential for both basal and induced transcription of *AtP5CS1*, that appears to play a major

role in controlling proline accumulation. Dark adaptation had less inhibitory effect on *AtP5CS2* gene expression and significantly enhanced *PDH* expression in shoots, but not in roots. Whereas ABA and salt stress resulted in similar induction of the *P5CS1* gene, the expression of *PDH* gene was efficiently inhibited by salt, but to a lesser extent by ABA. These data suggested that the induction of proline accumulation by ABA and salt stress in *Arabidopsis* is modulated by up-regulation of *P5CS1* and down-regulation of *PDH* genes.

We tested the effect of 24-epibrassinolide on the expression pattern of gene coding for key enzymes in proline metabolism, because it is known that *Arabidopsis* mutants with brassinosteroid deficiency show in transcriptional de-repression of certain light-regulated genes in the dark and enhanced expression of some stress inducible genes in the light. We determined that the increase of *AtP5CS1* mRNA levels by ABA and NaCl-treatment is inhibited by 24-epibrassinolide pretreatment in light and in the dark. 24-epibrassinolide had inhibitory effect on *AtP5CS2* gene only in leaves and had no effect on *PDH* gene expression.

We have determined the effect of altered ABA and brassinosteroid regulation on the genes encoding key enzymes involved in proline metabolism. In comparison to wild type, a 1.6-1.8-fold increase of total *AtP5CS1* transcript levels was observed in response to ABA and salt induction in seedlings that carried a mutation in the *pleiotropic regulatory locus 1 (prl1)* causing hypersensitivity to ABA. A similar moderate increase of *P5CS1* mRNA level was detected in the ABA-treated brassinosteroid deficient *det2* mutant. The elevated *AtP5CS1* transcription led to enhanced proline accumulation in *det2* and *prl1* mutant plants. As in the wild type plants, the pretreatment of seedlings with 0.1 μ M 24-epi-brassinolide for 3 days before ABA and salt induction, drastically reduced the *P5CS1* transcript levels in the *det2* and *prl1* mutants indicating that these mutations did not alleviate the inhibitory effect of brassinosteroid. Transcript levels of *P5CS2*, that showed some increase in the *det2* mutant, were also reduced about 2-fold in brassinolide-treated plants. The hybridization analysis indicated that brassinolide did not increase, but rather decreased the total amount of *PDH* mRNA in wild-type plants and, albeit to less extent, in the *prl1* and *det2* mutants. Subtle changes in the total amount of *PDH* mRNA reflected a reduction of *PDH* transcript levels in the uninduced *prl1* and ABA-treated *det2* mutants.

To demonstrate that changes observed at the level of transcript accumulation reflected alterations in transcriptional regulation and not on transcript stability of *AtP5CS* genes we generated transgenic plants carrying the *AtP5CS1::GUS* and *AtP5CS2::GUS* reporter gene constructs. The results of quantitative and histochemical GUS assays confirmed the previously obtained Northern hybridization results.

Finally, we can conclude that in contrast to previously reported data the bifunctional enzyme which catalyzes the rate limiting step of proline biosynthesis is encoded by two genes with different tissue specific expression and transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana*. Moreover transcriptional regulations of these *AtP5CS* genes have major role in proline accumulation during osmotic stress.

11. 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

Impakt faktor: 5.804

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.

Impakt faktor: 3.592

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.

Impakt faktor: 5.804

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.

Impakt faktor: 0.060

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)

Impakt faktor: 1.333

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)

Impakt faktor: 1.333