



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatika Kar
Biológia Doktori Iskola



Doktori értekezés tézisei

Az *Arabidopsis* Hősokk Faktor A4A szerepe a kombinált stresszválaszban

Andrási Norbert

Témavezetők:

Dr. Szabados László – tudományos tanácsadó

Dr. Rigó Gábor – tudományos munkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

**Szeged
2019**

Bevezetés

A természetben, az egyidejűleg ható környezeti hatások megnehezítik a helyhez kötött növények növekedését, fejlődését és szaporodását. Az evolúció során, a növények olyan összetett szabályozáson alapuló mechanizmust fejlesztettek ki, mellyel akár a legextrémebb környezethez is képesek alkalmazkodni és túlélni azok káros hatásait. A káros környezeti hatások kivédésére több stressz-indukált jelátviteli út aktiválódik, melyek összehangolt működése révén kialakul a stresszválasz, ami a növények alkalmazkodását eredményezi. A stresszválaszt kialakító jelátviteli utak több elemből állnak, melyekben megtaláljuk a növényi hormonokat, receptorokat, kinázokat, transzkripciós faktorokat és a stressz során keletkező reaktív oxigén származékokat is. A transzkripciós faktorok között fontos szerep jut a hőszokk faktoroknak (HSF), melyek inaktív formában a citoplazmában lokalizálódnak, majd stressz hatására aktiválódnak és a sejtmagba jutva fejtik ki hatásukat a génextpresszióra. A növényekben a hőszokk faktorok, többféle jelátviteli rendszer komponenseiként, részt vesznek a hő, só, szárazság, nehézfém, illetve oxidatív stressz során fellépő válasz szabályozásában. A stressz során a hőszokk faktorok szabályozzák a stressz-indukált gének aktiválódását, azáltal, hogy a célgén promoterén található hőszokk elemekhez kapcsolódnak. Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a hőszokk faktorok részt vesznek az egyedi stressztípusok során fellépő válaszok kialakításában, azonban kombinált stresszben betöltött szerepük kevésbé ismert. Csoportunkban már kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* HSF4A szabályozza a só és oxidatív stresszválaszt, illetve, hogy a MPK3 és MPK6 kinázok foszforilálják, és a Ser309 aminosav a domináns foszforilációs hely.

Munkám során folytattam a HSFA4A transzkripciós faktor jellemzését, hogy felderítsük szerepét a kombinált stresszben és az általa szabályozott stressz-jelátviteli útvonalakban.

Célkitűzések

A HSFA4A transzkripciós faktor jellemzésének folytatása, ezáltal jobban megérteni a faktor stresszválaszban betöltött szerepét.

- Génexpresszió változásának tanulmányozása *Arabidopsis* növényekben különböző stressz körülmények között.
- Saját promoteres, YFP-hez kapcsolt HSFA4A génkonstrukció expressziója transzgenikus *Arabidopsis* növényekben.
 - A génkonstrukció segítségével a fehérje szint változásának vizsgálata többféle stressznek kitett növényekben.
 - A HSFA4A-YFP fúziós fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata.
 - A HSFA4A-YFP alkalmazásával a HSFA4A fehérje promoter kötésének vizsgálata ChIP technika segítségével.
- A HSFA4A MPK4 kináz általi foszforilációjának felderítése, *in vivo* és *in vitro* foszforilációs helyek azonosítása.
- Foszforilációt imitáló és kizáró mutáns HSFA4A elkészítése.
 - A foszforiláció multimerizációban betöltött szerepének vizsgálata BiFC technikával.
 - A vad típusú és a foszforilációt imitáló mutáns HSFA4A túltermelésének hatása a túlélésre és oxidatív károsodásra só-, hő- és kombinált stresszben.

- Egy pontosabb modell kidolgozása a HSFA4A stressz jelátvitelben betöltött szerepéről.

Anyagok és módszerek

Növényi anyag és nevelési körülmények

Munkám során minden esetben *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípusú (Col-0) növényeket használtunk, valamint a transzgenikus növények (pHSFA4A::HSFA4A-YFP, pER8-HSFA4A-S309D és pER8-HSFA4A) is ezzel a háttérrel rendelkeztek. A növényeket a következő körülmények között neveltük: *in vitro*, steril ½MS táptalajon, 22°C hőmérsékleten, 8h fény/16h sötét fényciklussal, illetve 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ fényintenzitáson (kontroll körülmények).

A kísérletek során többféle stresszkörülményt (stresszkezelés) is alkalmaztunk, ahol minden esetben folyékony ½ MS táptalajt, 8h fény/16h sötét fényciklust és 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ fényintenzitást használtunk. A stresszkörülmények a kísérletek során a következők voltak: (1) sóstressz, mely során a táptalajt 100 mM vagy 150 mM NaCl (Molar Chemicals Kft) sóval egészítettük ki (hőmérséklet 22°C) (2) hőstressz, mely során nappali hőmérsékletnek 37°C, míg éjjelnek 30°C használtunk, illetve (3) kombinált stressz, mely során a só- és hőstresszt egyszerre alkalmaztuk.

A stressztűrés vizsgálata

A túltermelő és vad típusú növények stressztűrésének vizsgálatához túlélés tesztet és lipidperoxidációt végeztünk. A túlélés teszt során a tíz napos növényeket két, illetve négy napig kontroll és stresszkörülményekre

helyeztük, majd 10 nap kontroll körülményeken történő regeneráció után megszámloltuk a túlélő növények számát. A túlélő növényeket ép és károsodott kategóriákra osztottuk. A kontroll és stresszkezelt növények oxidatív károsodásának meghatározásához TBARS tesztet használtunk. A teszthez két napig stresszkezeltük a növényeket.

Egyéb módszerek

A *HSFA4A* gén transzkripciós vizsgálatához kontroll és stresszkezelt növényekből RNS-t izoláltunk, majd a cDNS átírás után, kvantitatív PCR-t (qPCR) végeztünk.

A fehérje szintben történő változások meghatározásához SDS-PAGE és Western blot technikát alkalmaztunk a stresszkezelt *HSFA4A*-YFP-t termelő transzgenikus növényeken.

A *HSFA4A*-YFP intracelluláris lokalizációjának meghatározásához konfokális lézerpasztázó mikroszkópot használtunk. A mikroszkópia során a növények egy-egy gyökérsejtjét vizsgáltuk, kontroll és sókezelés közben.

A *HSFA4A* multimerizációját nem-denaturáló PAGE és Western blot technika, illetve Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementáció (BiFC) segítségével vizsgáltuk. A BiFC során használt konstrukciókat *Arabidopsis* eredetű protoplasztokba transzformáltuk, majd konfokális mikroszkóppal ellenőriztük a dimerizációt.

A *HSFA4A* promoter kötését Kromatin Immunprecipitáció (ChIP) segítségével teszteltük. A kísérlethez három lehetséges célgén promoter kötését vizsgáltuk: *ZAT12*, *WRKY30* és *HSP17.6A* gének.

A *HSFA4A* fehérje MPK4 kináz általi foszforilációját *in vitro* teszteltük, míg a foszforilációs helyek meghatározásához *in vitro* és *in vivo* tömegspektrometriás méréseket végeztünk.

Az eredmények összefoglalása

A génexpressziós és Western blot kísérletek segítségével sikerült kimutatni, hogy a *HSFA4A* nem csak hő- és sóstressz, de kombinált hő- és sóstressz hatására is aktiválódik, illetve a fehérje mennyiségi változása összhangban van a gén indukciójával. Mikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy sókezelés hatására a YFP-jelölt HSFA4A mennyisége húsz percen belül megnövekszik a gyökérsejtek sejtmagjában, illetve két órással kezelés után sokkal erősebb fluoreszcencia figyelhető meg a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a hatásoktól függően a HSFA4A egyaránt részt vesz a korai és kései stresszválaszban is.

A hőshock faktorok több poszt-transzlációs módosításon mennek keresztül, mint például a foszforiláció vagy szumoiláció, melyek meghatározzák a HSF működését. Az MPK3/6 mellett az MPK4 kináz is foszforilálja a HSFA4A transzkripciós faktort, illetve e kináz esetében is a Ser309-es aminosav bizonyult az elsődleges foszforilációs helynek. *In vivo* kísérletekkel is sikerült kimutatni a MAP kinázok által *in vitro* körülmények között preferált aminosav csoportok foszforilációját, ugyanakkor olyan foszforilációs helyeket is azonosítottunk, melyek más kináz családok célpontjai lehetnek. Az adatok arra utalnak, hogy a HSFA4A egy összetett foszforilációs szabályozáson megy keresztül, melyben a MAP kinázokon kívül egyéb kinázok is részt vesznek.

A multimerizáció elengedhetetlen a HSF-ok működéséhez, hiszen trimereket alkotva válnak aktívvá és látják el transzkripciós funkciójukat a sejtmagban. A foszforiláció hatását a HSFA4A dimerizációra bimolekuláris fluoreszcens komplementációval (BiFC) vizsgáltuk. A kísérletekben egy

pozitív, illetve egy negatív foszforilációs mutánst és vad típusú HSFA4A-t juttattunk *Arabidopsis* protoplasztokba, majd fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk a transzformált sejteket. A foszforilációs mutánsok létrehozásához a Ser309-es aminosavat cseréltük alaninra (nem foszforiláló, negatív foszforilációs mutáns), illetve aszpartátra (foszforilációt imitáló, pozitív foszforilációs mutáns). Sikerült kimutatni, hogy a foszforiláció segíti a dimerizációt, de nem abszolút szükséges a létrejöttéhez. A foszforiláció szerepe mellett sikerült kimutatni azt is, hogy a sejtek redox állapota hatással lehet a multimerizációra, illetve más fehérjékkel történő kölcsönhatásokra *in vitro*, mely szintén alátámaszthatja azt a megfigyelést, miszerint a HSFA4A működését az oxidatív stressz is befolyásolhatja (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

A vad típusú és a pozitív foszforilációs mutáns *HSFA4A* túltermelése *Arabidopsis* növényekben kedvező hatással van a növények túlélésére, illetve mérsékeli a lipidperoxidáció mértékét só-, hő- és kombinált stressz során. Kísérletünk alapján elmondhatjuk, hogy mindkét *HSFA4A* változat képes növelni a stressztűrést az oxidatív károsodás csökkentésével, illetve a Ser309 foszforilációnak kedvezőbb hatása lehet a tolerancia kialakulására.

Pérez-Salamó és mtsai. (2014) kimutatták, hogy a HSFA4A túltermelése hatással van több stressz-indukált gén expressziójára, ugyanakkor most sikerült bizonyítani, hogy stressz hatására a HSFA4A mennyisége megnövekszik a sejtmagban. A hőszokk faktorok transzkripciós aktivitásukat és az említett eredményeket figyelembe véve, kromatin immunprecipitáció (ChIP) technikát használva, megvizsgáltuk néhány gén közvetlen kapcsolatát a HSFA4A transzkripciós faktoral. Kimutattuk, hogy a HSFA4A képes felismerni és megkötni a *ZAT12* és *WRKY30* transzkripciós faktor gének és a *HSP17.6A* kis hőszokk proteint kódoló gén promoterében található hőszokk elemeket, és a promoter kötés só-, hő- és kombinált stressz

hatására emelkedett. A ZAT12 és WRKY30 transzkripciós faktorok és a HSP17.6A hősokk protein is fontos szerepet töltenek be a stressz káros hatásainak kivédésében, melyek működését a HSFA4A közvetlenül képes szabályozni.

Eredményeink alapján, összességében elmondható, hogy a HSFA4A transzkripciós faktor összekapcsolja és szabályozza a stresszválasz kialakításában részt vevő jelátviteli út elemeit.

Köszönetnyilvánítás

A doktorim során végzett munkát a következő pályázatok támogatták: OTKA NN-110962, NKFI KH-129510 és GINOP 2.3.2-15-2016-00001.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10053161

A dolgozat alapját képező publikáció

Andrási N, Rigó G, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Papdi C, Klement E, Pettkó-Szandtner A, Baba AI, Ayaydin F, Dasari R, Cséplő Á, Szabados L. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Journal of Experimental Botany* *erz217*. IF: 5.36

Egyéb publikációk

Baba AI, **Andrási N**, Valkai I, Gorcsa T, Koczka L, Darula Z, Medzihradzky KF, Szabados L, Fehér A, Rigó G, Cséplő Á. (2019). AtCRK5 Protein Kinase Exhibits a Regulatory Role in Hypocotyl Hook Development during Skotomorphogenesis. *International Journal of Molecular Science* *20*, 3432. IF: 4.183

Baba AI, Rigó G, **Andrási N**, Tietz O, Palme K, Szabados L, Cséplő Á. (2019). Striving Towards Abiotic Stresses: Role of the Plant CDPK Superfamily Members. In: Palocz-Andresen M, Szalay D, Gosztom A, Sárosi L, Taligás T. (eds) *International Climate Protection*. Springer, Cham. 99-105, Book Chapter.

Baba AI, Rigó G, Ayaydin F, Rehman AU, **Andrási N**, Zsigmond L, Valkai I, Urbancsok J, Vass I, Pasternak T, Palme K, Szabados L, Cséplő Á. (2018). Functional Analysis of the *Arabidopsis thaliana* CDPK-Related Kinase Family: AtCRK1 Regulates Responses to Continuous Light. *International Journal of Molecular Science* *19*, 1282. IF: 4.183

Faragó D, Sass L, Valkai I, **Andrási N**, Szabados L. (2018). PlantSize Offers an Affordable, Non-destructive Method to Measure Plant Size and Color in Vitro. *Frontiers in Plant Science* *9*, 219. IF: 4.106

Konferenciák

Andrási N, Pérez-Salamó I, Rigó G, Boros B, Zsigmond L, Szabados L. (2013). Use of molecular technologies to improve stress tolerance of poplar. *IPA OXIT Conference, November 14-15. Novi Sad, Serbia. Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme.*

Baba AI, **Andrási N**, Rigó G, Szabados L, Cséplő Á. (2016). Regulation of plant gravitropic stress response by CRK5 protein kinase involving polar auxin transport (PAT) protein localization in etiolated *Arabidopsis thaliana*. *FIBOK Biotechnological Conference, March 21-22. Gödöllő, Hungary.*

Andrási N, Rigó G, Cséplő Á, Pérez-Salamó I, Szabados L. (2016). The role of MAP kinase-mediated phosphorylation in intramolecular interactions of the *Arabidopsis* heat shock factor A4A. *17. Kolozsvári Biológus Napok/17th Biology Days, April 8-9. Cluj-Napoca, Romania.*

Andrási N, Rigó G, Cséplő Á, Pérez-Salamó I, Szabados L. (2016). MAP kinase-mediated phosphorylation regulates intramolecular interactions of the *Arabidopsis* heat shock factor A4A. *Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, June 26-30. Prague, Czech Republic.*

Andrási N, Rigó G, Cséplő Á, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Baba AI, Klement É, Pettkó-Szandtner A, Szabados L. (2019). Role of Heat Shock Factor A4A in combined salt and heat stress responses. *20. Kolozsvári Biológus Napok/20th Biology Days, April 12-13. Cluj-Napoca, Romania.*

Andrási N, Rigó G, Cséplő Á, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Baba AI, Klement É, Pettkó-Szandtner A, Siddiqui S, Szabados L. (2019). The Heat Shock Factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Hungarian Molecular Life Science 2019, March 29-31. Eger, Hungary.*

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős és/vagy első szerzője igazolom, hogy Andrási Norbert Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

Andrási N, Rigó G, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Papdi C, Klement E, Pettkó-Szandtner A, Baba AI, Ayaydin F, Dasari R, Cséplő Á, Szabados L. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Journal of Experimental Botany* *erz217*.

Szeged, 2019. szeptember 10.

Dr. Szabados László
Tudományos tanácsadó
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Baba AI, **Andrási N**, Valkai I, Gorcsa T, Koczka L, Darula Z, Medzihradszky KF, Szabados L, Fehér A, Rigó G, Cséplő Á. (2019). AtCRK5 Protein Kinase Exhibits a Regulatory Role in Hypocotyl Hook Development during Skotomorphogenesis. *International Journal of Molecular Science* *20*, 3432.

Szeged, 2019. szeptember 10.

Abu Imran Baba
Tudományos segédmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Dr. Cséplő Ágnes
Tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont