

Ph.D. disszertáció tézisei

# **A brassinoszteroid bioszintézis génjeinek szabályozása**

Készítette: Simona Bancos

Témavezető: Szekeres Miklós

Magyar Tudományos Akadémia,  
Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet,  
Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem  
Molekuláris és Sejtbiológiai Program

Szeged  
2003.

## BEVEZETÉS

A magasabbrendű növényeknek egész életciklusuk folyamán flexibilisen adaptálódniuk kell mind a külső környezetből, mind a szervezetükből érkező ingerekhez. Ezeket a hatásokat az egyes sejtek receptorai (pl. fotoreceptorok) érzékelik, és ennek során intracelluláris válaszreakciókat indukálnak. A sejtveszélyes válaszok összehangolását, a szöveti és szerv szintű reakciók koordinálását a fitohormonok végzik, amelyek termelődését és hatékonyságát a környezeti tényezők közvetlenül befolyásolják.

A brassinoszteroidok (BR-ok) a növényi hormonok nemrég felismert önálló osztályát alkotják. Ezek a rovarok ecdizon hormonjához hasonló szerkezetű polihidroxi-szteroid vegyületek valamennyi edényes növényben előfordulnak, és meghatározó szerepet játszanak ezek megnyúlásában, fotomorfogenezisében, fertilitásában és stressz-érzékenységében. Bár a biológiailag legaktívabb BR-nak tekintett brassinolid (BL) szerkezetét csupán 1979-ben sikerült meghatározni, mára jórészt ismertté vált a BR-ok bioszintézise, másrészt megtörtént a hormonhatásért felelős jelátviteli komponensek többségének azonosítása.

A BR-ok pontos élettani szerepének, ezek molekuláris hátterének, valamint a hormon szintézis génjeinek meghatározásában alapvető jelentősége volt az ún. brassinoszteroid mutánsok vizsgálatának. Ezek az elsősorban *Arabidopsis thaliana*-ban létrehozott mutánsok jórészt törpe fenotípusúak, és két csoportba sorolhatók. Egy részüknél BL kezeléssel a vad fenotípus helyreállítható, jelezve, hogy a mutáció során a BR szintézis valamely génje sérült. A második csoportba tartozó mutánsok a szteroid hormonnal szemben érzéketlenek, törpeségük ilyen kezeléssel nem

korrigálható. Ezeknél valamely, a hormon érzékelésében vagy jelátvitelében résztvevő gén szenvedett mutációt.

Az *Arabidopsis thaliana* ún. *constitutive photomorphogenesis and dwarfism* (*cpd*) mutánsa nem szintetizál biológiailag aktív BR-okat. Az e mutáns segítségével azonosítható *CPD* gén egy citokróm P450 típusú szteroid hidroxilázt (CYP90A1) kódol, amely a BR oldallánc C-23-as pozíciójú hidroxilációjáért felelős. Ez az enzim a BR bioszintézis mindkét fő reakcióútjában szerepet játszik, ezért meghatározó lehet a szintézis hatékonyságának szabályozásában.

Csoportunk korábban kimutatta, hogy a *CPD* gén működését a BR koncentráció egy negatív visszacsatolás révén szabályozza, és hogy ez a hatás elsősorban a transzkripció szintjén érvényesül. A hormon homeosztázis tehát biztosítható a CYP90A1/CPD enzim kifejeződésének kontrollján keresztül. Emellett a *CPD* gén aktivitása jellegzetes egyedfejlődési és szerv-specificitást is mutatott, ami a BR bioszintézis térbeli és időbeli organizáltságára utalt.

A BR szintézis összes eddig azonosított enzime a citokróm P450 monooxygenázok csoportjába, ezen belül a CYP90 és CYP85 családokba tartozik. *Arabidopsis*-ban a CYP90A1-en és a C-22-hidroxiláz funkciójú CYP90B1-en kívül két további, ismeretlen katalitikus aktivitású CYP90 enzim is jelen van. A C-6 keto-csoport kialakítását végző CYP85A1 mellett előforduló CYP85A2 protein szerepe szintén a legutóbbi időkig tisztázatlan maradt.

A bővülő ismeretek ellenére a BR bioszintézis szabályozása, annak molekuláris háttere ismeretlen maradt. Tisztázásra várt, hogy a szintetikus folyamatok hol és mikor folynak a növény szervezetében, és ezek mennyiben befolyásolják a lokális hormon szintet. Eldöntendő maradt továbbá az is, hogy a bioszintetikus gének aktivitásától mennyiben függ a BR szintézis hatékonysága.

A brassinoszteroid bioszintézis reakcióútjai. Az ismerten, vagy feltételezeten citokróm P450-ek által katalizált lépéseket sötét nyilak jelölik. Az azonosított P450 enzimek és génjeik szimbólumait az egyes reakció-lépések mellett tüntettük fel.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja a BR bioszintézisben résztvevő gének szabályozásának megismerése volt, hogy ezáltal információt nyerjünk a szintézis menetéről és az endogén hormon szintre gyakorolt hatásáról. Elsősorban a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. Mennyiben határozzák meg a BR bioszintézis génjeinek kifejeződését hormonális, fejlődési és szerv-specifikus tényezők? Mennyiben hasonlók, ill. különbözőek e regulációs hatások az egyes gének esetében?
2. Kimutathatók-e szerv-specifikus különbségek a BR szintézis intermediereinek mennyiségében? Ha igen, ezek összhangban állnak-e a bioszintetikus gének lokális kifejeződésével?
3. Milyen molekuláris tényezők révén szabályozódik a BR bioszintézis génjeinek szabályozása, elsősorban is a *CPD* gén BR-ok általi negatív regulációja?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Növény anyag és nevelési körülmények
- Fitohormon kezelések
- RNS izolálás
- mRNS szint meghatározás reverz-transzkripció PCR (RT-PCR) segítségével
- mRNS szint meghatározás Northern-hibridizációval
- Endogén BR-ok mennyiségi meghatározása
- T-DNS-inszerció CYP90 mutánsok azonosítása

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. A BR bioszintézisben résztvevő *Arabidopsis CYP90* és *CYP85* proteinek és génjeik struktúrális analízise alapján megállapítottuk, hogy e két citokróm P450 család tagjai egymással szoros filogenetikai rokonságban állnak, és szétválásukra valószínűsíthetően a BR bioszintetikus funkció kialakulását követően került sor. Aminosav-szekvencia azonosságuk alapján ezen P450 családok csak a gibberellin bioszintézisben résztvevő CYP88 családdal állnak közeli rokonságban. Ugyanakkor csupán a citokróm P450-ek közti minimális egyezést mutatják két olyan, a CYP72 családba tartozó monooxygenázzal, amelyek a BR-ok inaktiválásában vesznek részt. Az vizsgált citokróm P450 családok génjeinek esetében az exon-intron szerkezet konzerváltsága is hasonló rokonsági viszonyokat tükrözött.

2. *Arabidopsis*-ban a CYP90A1, CYP90B1 és CYP85A1 enzimek BR bioszintetikus szerepe ismert volt, míg a CYP90 és CYP85 családok többi tagjának (CYP90C1, CYP90D1 és CYP85A2) funkciója tisztázása várt. Valamennyi *Arabidopsis CYP90* és *CYP85* mRNS szemikvantitatív RT-PCR analízisével megállapítottuk, hogy génjeik - a *CYP90A1/CPD*-hez hasonlóan - BL-függő negatív visszacsatolás által reguláltak. A BR-gátlás hasonló mértéke és kinetikája alapján feltételezhető, hogy e szabályozás ugyanazon (valószínűleg transkripció szintű) mechanizmus révén érvényesül, biztosítva ezáltal a szteroid hormon bioszintézis génjeinek koordinált expresszióját. A hormonkezeléssel kiváltható represszióval szemben a BR-deficiens *cpd* és *cbb3* mutánsokban magas *CYP90* és *CYP85* transzkriptum szinteket detektáltunk. Ez arra utal, hogy a BL általi szabályozásnak

fontos szerep jut a BR homeosztázis fenntartásában, hiszen fiziológiás hormonszint mellett képes a bioszintetikus gének aktivitásának mindkét irányú befolyásolására. Kimutattuk továbbá, hogy e regulációs folyamat a BRI1 BR receptorról kiinduló szignáltól függ, mivel a receptor-deficiens *bri1-2/cbb2* mutánsban a *CYP90* és *CYP85* gének kifejeződése BL-dal nem gátolható.

3. A BR bioszintetikus gének transzkriptumainak RT-PCR analízise kiderítette, hogy a korai egyedfejlődés során a *CYP90* és *CYP85* családok valamennyi tagja magas szintű kifejeződést mutat. A csírázást és korai csíranövény stádiumot magában foglaló első hét során az mRNS mennyiségek gyors növekedése volt megfigyelhető, amely egy határozott csúcsérték elérése után annak kb. 10%-ára csökkent a vizsgálati periódus végére. A második hét végéig az expresszió mértéke már nem mutatott számottevő változást. A *CYP90* és *CYP85* gének fokozott aktivitása összhangban áll a korai fejlődés folyamatainak magas BR igényével. Az egyes transzkriptumok indukciójának kezdete és időbeni lefutása közti különbségek ugyanakkor azt jelzik, hogy a tranziens aktiválódás nem egy egységes szabályozás következménye.

4. Az mRNS szintek vizsgálata fényt derített arra is, hogy a *CYP90* és *CYP85* gének kifejeződése (a *CYP90B1* kivételével) jellegzetes szerv-specifikus különbségeket mutat. A *CYP90A1* és *CYP85A2* esetében a föld feletti szervekben, míg a *CYP90C1*, *CYP90D1* és *CYP85A1* esetében a gyökérben észleltünk fokozott transzkriptum felhalmozódást. Ez a megoszlás fejlődési stádiumtól függetlennek bizonyult, de csíranövények esetében markánsabb különbségek voltak tapasztalhatók. Érdekes megemlíteni, hogy a BR bioszintézis génjeivel ellentétben

az abundáns szterol prekursorok szintéziséért felelős DIM1 és DET2 enzimek génjeinek expressziójában nem észleltünk szerv-specifitást. Adataink arra utalnak, hogy a *CYP90* és *CYP85* gének működésének térbeli szabályozása autonóm, a hormonális negatív visszacsatolástól alapvetően függetlenül ható folyamat. Ezt bizonyítja, hogy (1) a *CYP90A1* esetében az mRNS szint szerv-specifikus különbségei a BR-inszenzitív *bri1-2* mutánsban is kimutathatók, (2) vad típusú növények gyökerében a gyenge kifejeződés BL kezeléssel tovább csökkenthető, és hogy (3) az egyéges hormonális szabályozás ellenére a *CYP90* és *CYP85* gének különböző szerv-specifitást mutatnak.

**5.** Ezen eredmények tükrében feltehető volt, hogy a *CYP90* és *CYP85* gének aktivitásának térbeli kontrollja a BR bioszintézis szerv-specifikus különbségeivel járhat együtt. Ennek kiderítése céljából gáz-kromatográfiával kapcsolt tömegspektrográfias analízissel megvizsgáltuk a bioszintetikus intermedierek mennyiségi megoszlását *Arabidopsis*, borsó és paradicsom növények gyökerében és hajtásában. Ennek nyomán megállapítható volt, hogy az bár az egyes intermedierek szerv-specifikus felhalmozódásában markáns különbségek tapasztalhatók, az analizált három növényfaj esetében a különbségek hasonló tendenciát mutatnak. Ez annak a bizonyítéka, hogy a BR szintézis folyamatainak térbeli regulációja filogenetikailag konzervált funkció a magasabbrendű növények körében. Meglepő módon a korai bioszintetikus intermedierek felhalmozódása inkább a gyökérben, míg a BL-hoz közelebb eső prekursoroké inkább a hajtásban volt észlelhető. E jelenség oka feltehetően az, hogy a gyökerek fokozott BR-érzékenysége miatt fejlődésüket az utóbbi - esetleg már biológiailag aktív - BR alakok felhalmozódása gátolná. Figyelemre méltó a *CYP90A1/CPD* enzim szubsztrátjának magas szintje a

gyökérben. Mivel a *CPD* gén gyökérben igen alacsony szinten fejeződik ki, ezért szubsztrátjának felhalmozódása arra utal, hogy a transzkripciós regulációnak meghatározó szerepe lehet a CYP90A1 enzimatis aktivitásának, és ennek nyomán a BR bioszintézis hatékonyságának szabályozásában.

6. A tisztázatlan funkciójú CYP90C1, CYP90D1 és CYP85A2 esetében a BR bioszintetikus enzimekkel való strukturális rokonságuk és BR-regulált expressziójuk alapján valószínűsíthető, hogy ezek is a szteroid hormon szintézisben vesznek részt. E bioszintetikus útnak két konverziós lépéséről is feltételezhető, hogy azokat citokróm P450-ek katalizálják. Ez év folyamán vált ismertté, hogy a CYP85A2 a CYP85A1-gyel megegyező specificitású szteroid C-6 oxidáz. A továbbra is felderítetlen, valószínűleg redundáns szerepű CYP90C1 és CYP90D1 funkciójának tisztázása céljából Dr. Koncz Csaba (Max Planck Intézet, Köln) T-DNS-inszerciós *Arabidopsis* mutáns gyűjteményéből PCR alapú módszerrel e funkciókban defektív mutánsokat azonosítottunk. A homozigóta *cyp90c1* és *cyp90d1* vonalak létrehozása és ellenőrzése után az ezek keresztezésével kialakítandó kettős mutáns várhatóan BR-deficiens törpe fenotípusú lesz, és biokémiai karakterizálásával lehetőség nyílik a CYP90C1 és CYP90D1 fehérjék enzimatis szerepének azonosítására.

7. Megállapítottuk, hogy a *CYP90* és *CYP85* gének BR-függő repressziója markánsan eltér a laboratóriumunkban korábban azonosított, egy RING-finger proteint kódoló *BRH1* gén BR általi gátlásától. A BR bioszintetikus gének aktivitása BL kezelést követően egy nagyságrenddel csökkenthető, és a hatás kialakulásához *de novo* fehérjeszintézis szükséges. Ezzel szemben BL hatására a *BRH1*

transzkriptum mennyisége csupán harmadára esik vissza, és a represszió fehérjeszintézis gátlókkal nem felfüggeszthető primér hormonválasznak tekinthető.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink alapján megállapítható volt, hogy a BR bioszintézisben résztvevő citokróm P450 enzimek génjei komplex transzkripciók reguláció alatt állnak. Az mRNS szintek analízise nyomán kimutattuk, hogy az *Arabidopsis CYP90* és *CYP85* gének aktivitása végtermék-függő negatív visszacsatolás által szabályozott, és emellett egyedfejlődési stádiumtól függő, valamint szerv-specifikus kifejeződést is mutat. A bioszintetikus gének mRNS szintjének és az endogén BR intermedierek mennyiségének összevetése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a transzkripciók szintű regulációnak lényeges szerepe van a BR szintézis hatékonyságának meghatározásában, időbeni és térbeli koordinálásában. Adataink alapul szolgálhatnak az BR bioszintézis szempontjából fontos szervek és szövetek azonosításához, aktivitási periódusuk megismeréséhez. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a még tisztázatlan szerepű *CYP90C1* és *CYP90D1* enzimek is BR-bioszintetikus funkcióval rendelkeznek. Azáltal, hogy ezen funkciókban deficiens *Arabidopsis* mutánsokat izoláltunk, lehetőség nyílik a *CYP90C1* és *CYP90D1* által katalizált konverziós lépés azonosítására. A BR bioszintézis génjeinek, továbbá ezek regulációjának megismerése révén közelebb juthatunk annak felderítéséhez, hogy milyen tényezők és miként befolyásolják a növényi szteroid hormonok termelődését.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnár G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M (2002) Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 130: 504-513

Molnár G, Bancos S, Nagy F, Szekeres M (2002) Characterisation of *BRH1*, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 127-133