

**Az *Arabidopsis thaliana* P5CS génjeinek
szabályozása**

Székely Gyöngyi

Témavezető: Dr. Szabados László

Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport
Növénybiológiai Intézet

Szegedi Biológiai Központ
Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

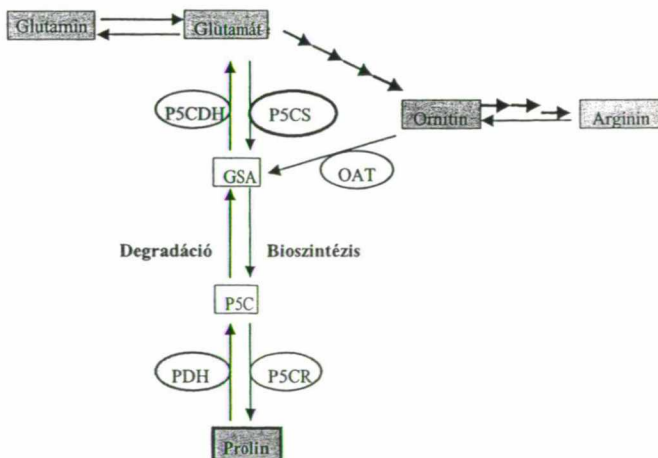
Szeged
2007



BEVEZETÉS

A prolin, egy erősen vízóldékony aminosav, szárazság stressz hatására halmozódik fel a növények levélszövetekben és csúcsmerisztémákban, szárazság stresszhez alkalmazkodott sejtszuspenziókban, alacsony vízpotenciál és NaCl jelenlétében a növények gyökércsúcs régióiban, valamint a kiszáradó pollenben. A prolin felhalmozódása a szárazság- és só-stressznek kitett magasabbrendű növények egyik legáltalánosabb életteni válasza.

Magasabbrendű növényekben a prolin szintézisének kiinduló anyaga a glutamát vagy az ornitin; e folyamat a sejtek citoplazmájában történik. A szabad prolin szint katabolikusan is ellenőrzött folyamat. Stressz hatására a glutamát út dominál, ebben a bioszintetikus útban fontos szerepet játszik a bifunkcionális P5CS (pirrolin-5-karboxilát-szintáz) enzim, aminek hatására kialakul a P5C (pirrolin-5- karboxilát) köztestermék, amit a P5CR (pirrolin-5-karboxilát-reduktáz) enzim prolinná redukál. A katabolikus folyamatban a prolin glutamáttá oxidálódik a sejtek mitokondriumaiban. A lebontásban korlátozó szerepe van a PDH (prolin-dehidrogenáz), valamint a P5CDH (P5C-dehidrogenáz) enzimeknek.



A prolin bioszintézise és lebontása magasabbrendű növényekben

Rövidítések: GSA: glutamil-szemialdehid, P5C: pirrolin-5-karboxilát, P5CS: delta-1-pirrolin-5-karboxilát-szintáz, P5CR: pirrolin-5- karboxilát reduktáz, PDH: prolin dehidrogenáz, P5CDH: P5C-dehidrogenáz, OAT: ornitin aminotranszferáz.

Több különböző vizsgálat fényt derített a prolin élettani szerepére: ozmoprotektánsként védő hatást fejt ki a baktériumok, gombák, gerinctelen állatok és növények sejtalkotóira, felhalmozódva védi a növényeket az UV sugárzás és nehézfémek okozta károk enyhítésében a lipidek peroxidációját csökkentve, antioxidánsként csökkenti a szabad reaktív gyökök mennyiségét (gyökcsapdaként is működhet). A prolin pozitív hatással bír a kétszikű növények megtermékenyítésében, de a humán kutatások apoptózis indukáló szerepét is felfedték.

A prolin metabolikus szerepének meghatározásában alapvető jelentősége volt az *Arabidopsis thaliana*-ban létrehozott *p5cs* mutánsok (*p5cs1* és *p5cs2*) vizsgálata.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja a prolin bioszintézisében résztvevő gének szabályozásának megismerése volt, hogy ezáltal tudomást szerezzünk a *P5CS1* és *P5CS2* gének *Arabidopsis thaliana*-ban betöltött szerepéről. A következő fő kérdéseket kívántuk megválaszolni:

1. Befolyásolja-e a prolin felhalmozódást a *P5CS* gének mutációja?
2. Milyen hatással van a *P5CS* gének inszerciós mutációja a sótűrésre vagy az oxidatív védekező mechanizmusokra nézve?
3. Hogyan befolyásolja a szárazság a *p5cs* mutánsok relatív víztartalmát?
4. Milyen élettani változásokat idéz elő a *P5CS* gének knockout mutációja?
5. Megfigyelhetők-e különbségek a *P5CS* gének térbeli kifejeződésében?
6. Tudva azt, hogy a *P5CS1* és *P5CS2* fehérje 89%-ban homológ, van-e különbség a *P5CS* fehérjék intracelluláris lokalizációja között?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Növényi anyag és nevelési körülmények
- *p5cs* inszerciós mutánsok azonosítása és jellemzése
- A *p5cs2* mutáns embriók fenntartása és *in vitro* tenyésztése
- A H₂O₂ meghatározás DAB (3,3-diaminobenzidine) festéssel
- Lipid peroxidáció meghatározás
- Klorofill tartalom meghatározás
- Aminosav meghatározás
- Antioxidatív enzimek meghatározása
- Növekedési tesztek és víztartalom mérés
- RNS izolálás
- RNS szint meghatározás reverz-transzkripció PCR (RT-PCR) segítségével
- *In situ* hibridizáció
- Fehérje lokalizáció
- Mikroszkópos megfigyelések

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A prolin bioszintézisében résztvevő *Arabidopsis P5CS1* és *P5CS2* gén transzkripció szabályozásának elemzése során megállapítottuk, hogy e két erősen homológ gén funkcionális különbségekkel rendelkezik és bizonyítottuk, hogy szerepük nélkülözhetetlen. A transzkripció szabályozásban tapasztalt változásokat a promoter-reporter génfúziók, valamint az *in situ* hibridizációs kísérletekből nyert adatok is alátámasztják, amely adatok eltérő szerv- és szövetspecifikus működést mutatnak.

Optimális növekedési körülmények között, a vizsgált *p5cs1* mutáns vonalak szabályosan fejlődnek, annak ellenére, hogy a levelükből mért szabad prolin szint 15-30%-kal, virágzatukban pedig 35-45%-kal maradt el a kontrollként használt vad típusú növényekhez viszonyítva. Szárazság- vagy só-stressz hatására a *p5cs1* mutáns növények 3-4-szer kevesebb mennyiségű prolint halmoznak fel a vad típusú növényekhez képest.

Számos irodalmi adat bizonyítja a prolin, mint ozmoprotektív molekula szerepét. Ennek tanulmányozására lehetőséget nyújtanak a *p5cs* inszerciós mutánsok, mivel a

mutációk meggátolják a prolin bioszintézisét és rámutatnak a prolinhiány következményeire ozmotikus stressz alkalmával. Kísérleteinkben, a szárazságnak kitett *p5cs1* mutáns növények alacsony prolin szint felhalmozódással válaszolnak, ami összhangban van a bennük mért alacsony relatív víztartalommal (RWC).

A kontrollként használt vad típusú növényekhez viszonyítva, a *p5cs1* mutánsok sőtűrési képessége alacsonyabb, amit a csökkent gyökérhossz, a levelek feltűnő klorózisa, és végül a csíranövények pusztulása bizonyít 150-200 mM NaCl jelenlétében. A *p5cs1* mutánsok alacsony prolin szintje fokozott sóérzékenységhoz vezet, nemcsak a hibás ozmotikus szabályozás miatt, hanem a magas szintű reaktív oxigéngyökök felhalmozódása miatt is. A só-stressznek kitett *p5cs1* mutánsok leveleinek fokozott klorózisa, klorofill degradációja és a lipidek peroxidációja, a reaktív oxigéngyökök által okozott károsodásra utal. Eredményeink rámutatnak a prolin antioxidánsként betöltött szerepére.

Bebizonyítottuk, hogy ozmotikus stressz hiányában a *p5cs1* mutánsok vegetatív és generatív szervei szabályosan fejlődnek és teljes mértékben fertilibek. Másrészt, a *p5cs2* mutációk az embrió halálát okozzák torpedó vagy kifejtett állapotban, a levegő páratartalma és a növekedési körülmények függvényében. Az a megfigyelés, hogy a homozigóta *p5cs2* mutánsok csak külsőleg adagolt prolin hatására képesek fejlődni, de így is súlyos fejlődési zavarokat mutatnak, bizonyítja azt, hogy a korábban leírt antiszenz *P5CS1* növényeknél tapasztalt fejlődési rendellenességeket a *P5CS2* gén részleges gátlása okozhatja. A *p5cs2* mutáns embriók halálát a magfejlődés során fellépő prolinhiány okozhatja, valamint a káros reaktív oxigéngyökök felhalmozódása.

Az *in situ* hibridizáció és *in vivo* P5CS-GFP expressziós elemzések által kimutattuk, hogy mindkét *P5CS* gén átíródik a fejlődő embriókban. Meglepetésünkre, a P5CS1-GFP sejten belüli testecskék formájában halmozódik fel az embrió összes fejlődési szakaszaiban. Elméletünk szerint a *p5cs2* embriók halála azért következik be, mert a P5CS1 fehérje e testecskékben való felhalmozódása prolinhiányhoz vezet a citoplazmatikus P5CS2 enzim hiányában az embrió fejlődése során.

Kísérleteink arra utalnak, hogy az *Arabidopsis P5CS* gének funkcionális különbözősége megmutatkozik nemcsak transzkripció, hanem intracelluláris lokalizációs szinten is. A csíranövények gyökérszövegeiben a következő térbeli mintázatot találtuk: a P5CS1-GFP a gyökérsüvegben nem expresszálódik, míg a P5CS2-GFP gyökérsüveg lokalizációt mutatott. Az oldalgyökereknél P5CS-GFP lokalizációs különbséget nem találtunk. A P5CS2-GFP expressziója a levél primordiumban, valamint a csúcs- és hajtásmerisztéma sejtekben figyelhető meg. A P5CS1-GFP az említett szövetekben nem

fejződik ki a csíranövény fejlődésének egyik szakaszában sem. A virágokban a *P5CS1-GFP* csak a portokokban, míg a *P5CS2-GFP* a portokokban, a porzószámban, a csésze- és szíromlevelekben is kifejződik. Sejten belül a *P5CS1-GFP* a kifejlett levelek kloroplasztiszaiban és kevésbé a sejtek citoplazmájában expresszálódik, míg a *P5CS2-GFP* kifejződése úgy a kloroplasztiszokban, mint a citoplazmában is megfigyelhető.

KÖVETKEZTETÉSEK

A szárazság indukció hatására felhalmozódó szabad prolinszintet főleg a *P5CS1* gén szabályozza, és e stresszhez kapcsolódó funkcióhiányt a *P5CS2* gén nem képes teljes egészében pótolni. A szárazság stressz mellett, a *P5CS1* gén kulcsszerepet játszik a prolinszint felhalmozódásának szabályozásában só-stressz alkalmával is, és ezt a szerepet a *P5CS2* gén szintén nem képes teljes egészében pótolni. A *p5cs1* mutánsok fokozott sóérzékenysége azt bizonyítja, hogy a *P5CS1* gén által szabályozott prolinfelhalmozódás alapvető szerepet játszik a só-stressz toleranciában.

Az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó enzimek közül sókezelés hatására csak a kataláz enzim aktivitása nőtt meg átlagosan 80-120%-kal a *p5cs1* mutánsokban, ami azt mutatja, hogy a *P5CS1* gén-elősegíti a kataláz aktivizálása révén az oxidatív károsodások kivédését.

Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a *P5CS1* enzim elsődleges szerepe az ozmotikus stresszválaszra felhalmozódó prolinszint szabályozásában van, míg a *P5CS2* enzim egyike a megfelelő embrió fejlődésért felelős létfontosságú enzimeknek.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Ábrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C and Szabados L (2003): Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, **51**: 363-72, **IF: 3,328**

Székely G (2004): The role of proline in *Arabidopsis thaliana* osmotic stress response. *Acta Biologica Szegediensis*, **48**: 81

Székely G, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz C and Szabados L (2007): Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* perform distinct regulatory functions in proline biosynthesis. *Plant Journal*, Nyomtatás alatt, **IF: 6,565**