

**A brassinoszteroid bioszintézis és érzékelés napszakos
szabályozása**

Ph.D. értekezés tézisei

Készítette: Szatmári Anna-Mária

Témavezető: Dr. Szekeres Miklós

MTA Szegedi Biológiai Központ

Növénybiológiai Intézet

Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem

Molekuláris és Sejtbiológia Doktori Program

Szeged

2007.

BEVEZETÉS

A brasszinoszteroidok (BR) az edényes növényekben általánosan előforduló polihidroxilált szteroid vegyületek. Erős növekedést és megnyúlást serkentő hatásuk van, melyet igen alacsony, nM-os koncentráció mellett fejtik ki. A megnyúlásos folyamatok szabályozásán túl meghatározó szerepük van a fényfüggő morfogénikus folyamatok irányításában, a fertilitás és csírázás biztosításában, valamint az abiotikus stressztényezőkkel szembeni ellenállóképesség növelésében is. Elterjedésük és esszenciális szerepük miatt mára már elfogadottá vált, hogy a BR-ok a növényi hormonok önálló családját képezik. Az auxin és gibberellin hormonsaládokkal együtt a növekedésserkentő fitohormonok közé sorolhatók. Biológiai hatásukat szintézisük közvetlen közelében fejtik ki.

Mára már viszonylag pontosan tisztázódtak a BR bioszintézis egyes lépései, és sikerült azonosítani az ezekben résztvevő enzimek génjeinek többségét is. A BR-ok a növényi fitoszterolokból képződnek, bioszintézisük számos, főként oxidatív lépést követően jut el a két biológiailag aktív végtermékhez, a kasztaszteronhoz és a brasszinoolidhoz. Valamennyi oxidatív reakciót citokróm P450 típusú monooxigenázok katalizálnak, melyek az egymással szoros rokonságot mutató CYP85 és CYP90 családokba tartoznak. Az endogén hormonkoncentráció függ a *de novo* hormonszintézistől, ami a bioszintézis sebességmeghatározó lépéseit katalizáló enzimek aktivitásától függ. Ilyen funkciójú enzimet kódol a *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM (CPD)*, valamint a *CYP85A2* gén. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy *Arabidopsis thaliana*-ban (lúdfű) valamennyi BR bioszintetikus P450 kifejeződése fejlődési stádiumtól függő, valamint szervspecifikus szabályozás alatt áll, mely elsődlegesen a transzkripció szintjén valósul meg. További kísérletek azt is kimutatták, hogy ezen gének expressziója az aktív BR-ok általi negatív végtermékgátlásos szabályozás alatt áll, mely a BRI1 BR receptor révén valósul meg.

A növények fejlődését az endogén programok és a környezeti tényezők közti kölcsönhatás határozza meg. Az utóbbiak közül a fény a legfontosabb tényező, mely nemcsak a fotoszintézis energiaforrása, hanem kihat a növény egész egyedfejlődésére. A fény és hőmérsékleti viszonyok napi rendszeres változásait követve a növények alapvető anyagcsere folyamatai és életfunkciói is lényeges átrendeződésen mennek át. Ezen napi rendszeres változásokhoz történő alkalmazkodásban fontos szerepe van a belső biológiai óra által meghatározott, ún. cirkadián regulációnak, mely elősegíti, hogy a növény időben felkészüljön a környezeti viszonyokban bekövetkező várható változásokra. A cirkadián reguláció a közvetlen (diurnális) fényszabályozás által meghatározott,

erre épülve, és vele összhangban fejt ki hatását. A cirkadián szabályozást a külső fény és hőmérsékleti viszonyok állítják be, de ezt követően több napon keresztül állandó környezeti körülmények közt is képes biztosítani az általa szabályozott folyamatok nagyjából 24 órás periodicitását. A diurnális (napszakos) regulációt a külső tényezők, alapvetően a fitokróm, ill. kriptokróm fotoreceptorok által közvetített fényingerek határozzák meg. Ez a két szabályozó folyamat hatással van több fontos hormon aktuális szintjére, valamint a hormonérzékenység mértékére is. Míg az etilén és gibberellinek esetében viszonylag jól ismert volt a bioszintetikus gének fényfüggő regulációja, addig a BR anyagcsere fényszabályozásáról igen kevés adat állt rendelkezésre. Vizsgálataink munkacsoportunk azon előzetes eredményeiből indultak ki, amelyek a brassinoszteroid bioszintézis kulcsenzimeit kódoló gének napszakos szabályozottságára utaltak.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja azoknak a főbb környezeti és endogén tényezőknek az azonosítása volt, melyek szerepet játszanak a BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* gének napszakos kifejeződésének szabályozásában. Ehhez szükséges volt:

1. A *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* napszakos kifejeződésének jellemzése, és az ezek kialakításában résztvevő alapvető regulációs rendszerek meghatározása.
2. A fény szabályozó szerepének tisztázása, és az ezt közvetítő szignálok azonosítása.
3. A BR bioszintézisben résztvevő P450 gének ismert transzkripciós szintű végtermékgátlása és a napszakos szabályozás közti kapcsolat tisztázása.
4. Annak kiderítése, hogy a *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* diurnális kifejeződése együtt jár-e a BR-ok mennyiségének napszakos változásával.

MÓDSZEREK

- Luciferáz riporter konstrukciók létrehozása
- Transzgenikus *Arabidopsis* növényvonalak előállítása és fenntartása
- *In vivo* lumineszcencia-mérés növényekben
- Növényi össz-RNS tisztítás
- Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis (RT-PCR)
- Northern hibridizáció

- Endogén BR-ok izolálása és mennyiségi meghatározása

EREDMÉNYEK

1. A *CPD* és *CYP85A2* gének kifejeződését *in vivo* lumineszcencia mérésrel követtük nyomon ezen gének promóter-luciferáz riportergén konstrukciót hordozó transzgenikus növényekben. Fény/sötét (LD) körülmények között vizsgálva a *CPD* promóter aktivitását azt kaptuk, hogy a 24 órás ciklusok folyamán az aktivitási értékek jellegzetes bifázisos görbét adtak, amelynek maximumai a fényszakasz kezdete utáni első, ill. annak végével egybeeső időpontokra estek. A *CYP85A2* gén kifejeződésének vizsgálata során a kapott expressziós profil a *CPD*-éhez igen hasonló, két maximumot mutató görbét adott. A két BR bioszintézis gén napi expressziós profiljának hasonlósága arra utal, hogy kialakulásukban közös szabályozási mechanizmusok vehetnek részt. A luciferáz riportergén konstrukciókkal kapott adatok megbízhatóságának az ellenőrzése céljából a luciferáz aktivitás mérésekhez használt mintákkal párhuzamosan, azonos körülmények között nevelt csíranövényekből RT-PCR analízis segítségével meghatároztuk az endogén *CPD*-ről átírt mRNS mennyiségének alakulását is. Eredményeink azt mutatták, hogy transzkriptum mennyiségek a nap folyamán összhangban változtak a mért luciferáz aktivitásokkal, ami igazolta, hogy a luciferáz riportergén konstrukciók révén megbízható képet kaphatunk a promóter aktivitás napi alakulásáról.

2. A fény szabályozó szerepének a kiderítése végett a *CPD:LUC* csíranövények biolumineszcenciájának időbeni változásait megvizsgáltuk konstans fényviszonyok között is. Méréseink során folyamatos fényben a lumineszcencia értékek szabályos, nagyjából 24 órás ciklusokat mutató, cirkadián oszcillációját észleltük, amely a több napon keresztül fennmaradt. A cirkadián kifejeződési görbe minimumai a relatív nappalok, míg maximumai a relatív éjszakák közepére estek. Ezt a cirkadián profilt folyamatos sötétben is megfigyeltük, de a *CPD* expresszió szintje a mérés során gyorsan csökkent, ami egyre kisebb a cirkadián amplitudóhoz, végül pedig a ciklusok eltűnéséhez vezetett. LD viszonyok mellett a *CPD* expressziójában bekövetkező gyors változások a fény/sötét szakaszok határaival esnek egybe, ahol hirtelen növekedés tapasztalható a fény szakasz kezdetén, illetve hirtelen visszaesés a sötét periódus kezdetén. Mindezen eredmények a fénynek a *CPD* expresszióra gyakorolt induktív hatására utalnak.

3. A *CPD* gén LD és folyamatos fényben (LL) mért kifejeződési profiljainak összehasonlításakor megfigyeltük, hogy az LD görbén felismerhető a cirkadián oszcilláció minimuma a fényszakasz közepén, valamint egy határozott vállként annak maximuma is a sötét

periódus közepén. Mindez arra utal, hogy a *CPD* napszakos (LD) kifejeződését egy alapszintű cirkadián oszcilláció, valamint egy erre ráépülő pozitív fényreguláció együttesen határozza meg.

4. A fitokróm, ill. kriptokróm fotoreceptorok specifikus aktiválására alkalmas monokromatikus vörös, ill. kék fotoperiódusok mellett vizsgálva a *CPD* kifejeződését azt tapasztaltuk, hogy a vörös/sötét ciklusokban a gén aktivitása a LD profilhoz hasonló lefutású, ami arra utal, hogy a vörös fény önmagában elegendő a fény szabályozás fenntartásához. Ez azt sugallja, hogy a fényválasz kialakításában a fitokrómoknak, illetve a róluk kiinduló szignálutaknak van meghatározó szerepük. Kék/sötét periódusok mellett viszont a kifejeződési szint erőteljes csökkenését tapasztaltuk. A *CPD:LUC* transzgén LD kifejeződését fitokróm-hiányos *phyAphyB* háttérben vizsgálva a vad típusú kontrolléhoz viszonyítva jóval alacsonyabb génaktivitást kaptunk. Emellett eltérő volt az expressziós görbe lefutása is: a fitokróm-hiányos növényekben a *CPD* kifejeződését alapvetően a cirkadián oszcilláció határozta meg. Ez az eredmény megerősíti, hogy a *CPD* aktivitásának fény szabályozásában a fitokrómoknak van meghatározó szerepük.

5. Megvizsgáltuk a *CPD:LUC* transzgén kifejeződését BR-inszenzitív mutáns háttérben is, ahol a BRI1 BR receptor hiánya miatt a hormonális végtermékgátlás nem érvényesül. LD körülmények között a transzgén expressziós profilja hasonló volt ahhoz, amit a vad típusú háttérben kaptunk, ami arra utal, hogy a *CPD* napszakos szabályozása alapvetően független a végtermékgátlásos szabályozástól. Folyamatos sötétben viszont azt tapasztaltuk, hogy *bri1* háttérben a *CPD* expressziója a vad típusúéval ellentétben nem csökken. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a *CPD* sötétbeni repressziója a BR szabályozáson keresztül valósul meg.

6. Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízis segítségével meghatároztuk a csíranövények endogén BR tartalmának alakulását egy 24 órás ciklus folyamán. Eredményeink a bioaktív brasszínolid jelentős átmeneti felhalmozódását mutatták a fény periódus közepén. Bár közvetlenül ez nem bizonyítja a *CPD* és *CYP85A2* gének napszakos expressziója, ill. a brasszínolid mennyiségének napi változásai közti kapcsolatot, figyelemreméltó, hogy a brasszínolid szint a bioszintézis génjeinek reggeli fényindukcióját követően mutat emelkedést.

7. A folyamatos sötétnek a hormontartalomra gyakorolt hatásának tisztázása végett meghatároztuk a BR tartalom alakulását 48 órás sötét kezelést követően. A GC-MS analízis eredménye azt mutatta, hogy tartós sötétben a bioaktív BR-ok mennyisége érdemben nem változik. Ennek alapján a *CPD* expresszió sötétbeni hormonális gátlása nem a BR szint emelkedésének, hanem a BR érzékenység fokozódásának lehet a következménye.

8. Kísérleteink kimutatták, hogy folyamatos sötétben a *CPD* repressziója a BZR1 transzkripciós faktor által mediált hormonális BR regulációnak köszönhető. Northern-blot

analízissal igazoltuk, hogy inaktivált BZR1 kötőhelyet tartalmazó mutáns *CPD* promóter (*mCPD*) esetében nem érvényesül a transzkripció végtermékgátlás általi szabályozása. A transzgenikus csíranövények lumineszcencia adatai azt mutatták, hogy az *mCPD:LUC* transzgén aktivitása tartós sötétben a *CPD:LUC*-hoz viszonyítva kevésbé represszálódik, és expressziójában fennmarad a cirkadián oszcilláció. Mindez igazolta azt a feltevésünket, hogy a *CPD* gén aktivitásának sötétbeni repressziója elsődlegesen a hormonális szabályozás következménye.

VÉGKÖVETKEZTETÉSEK

A *CPD* és *CYP85A2* gének napszakos kifejeződést mutatnak, amelyet egy cirkadián szabályozás, és az arra ráépülő pozitív fény szabályozás együttesen határoz meg.

A *CPD* és *CYP85A2* fényindukciójában a fitokróm fotoreceptorokról kiinduló jelátviteli rendszernek van meghatározó szerepe.

A *CPD* expressziójának napszakos regulációja független a hormonális szabályozástól, viszont sötétbeni repressziójáért a bioaktív BR-ok általi végtermékgátlás a felelős. A génaktivitás gátlásáért a folyamatos sötétben kialakuló hormonérzékenység növekedés a felelős.

A bioaktív BR formák mennyiségének napszakos ingadozása összhangban áll a *CPD* és *CYP85A2* gének expressziójának változásaival.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Bishop G, Nomura T, Yokota T, Montoya T, Castle J, Harrison K, Kushiro T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Bancos S, Szatmári A-M, Szekeres M (2006) Dwarfism and P450-mediated C-6 oxidation of plant steroid hormones. *Biochem Soc Trans* 34: 1199-1201

A disszertáció anyagából megjelent közlemények:

Bancos S, Szatmári A-M., Castle J, Kozma-Bognár L, Shibata K, Yokota T, Bishop GJ, Nagy F, Szekeres M (2006) Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 299-309 (megosztott első szerzőséggel)

Ohnishi T, Szatmári A-M, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K, Szekeres M, Mizutani M (2006) C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 18: 3275-3288 (megosztott első szerzőséggel)