

**Új genetikai stratégia kidolgozása az
Arabidopsis stressz válaszát szabályzó gének
azonosítására**

Ph.D. értekezés

Papdi Csaba

Témavezető: Dr. Szabados László

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológia Intézet
SZTE-TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szeged 2010

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	NÖVÉNYI STRESSZ VÁLASZOK OZMOTIKUS STRESSZ SORÁN	4
2.1.1	<i>A stressz érzékelése</i>	5
2.1.2	<i>Másodlagos jelátviteli mechanizmusok ozmotikus stressz válasz során</i>	7
2.1.3	<i>Az ABS szerepe a stressz válaszokban</i>	9
2.1.4	<i>A génkifejeződés változásai ozmotikus stressz során</i>	10
2.1.5	<i>A stressz válaszok epigenetikus szabályozása</i>	13
2.2	GENETIKAI STRATÉGIÁK ALKALMAZÁSA AZ ABIOTIKUS STRESSZ VÁLASZ SZABÁLYZÓ GÉNEK AZONOSÍTÁSÁRA.....	14
2.2.1	<i>Klasszikus mutagenézis és mutáns azonosítás.....</i>	14
2.2.2	<i>Inszerációs mutagenézis.....</i>	15
2.2.3	<i>Gén csapdázás</i>	15
2.2.4	<i>Aktiváció-jelölés</i>	16
2.2.5	<i>cDNS könyvtár transzformáció.....</i>	17
2.2.6	<i>Fordított genetikai analízis.....</i>	17
2.3	AZ ARABIDOPSIS ALKOHOL DEHIDROGENÁZ I GÉN TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA.....	18
3	CÉLKITŰZÉSEK	20
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
4.1	FELHASZNÁLT BAKTÉRIUM TÖRZSEK NÖVESZTÉSE ÉS SZELEKCIÓJA.....	21
4.2	FELHASZNÁLT NÖVÉNYI VONALAK ÉS NEVELÉSÜK	21
4.3	ARABIDOPSIS SEJTSZUSZPENZIÓ KULTÚRÁK NÖVESZTÉSE.....	22
4.4	ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	22
4.4.1	<i>Plazmidok tisztítása és genetikai módosítása</i>	22
4.4.2	<i>Növényi molekuláris biológiai módszerek</i>	23
4.4.3	<i>Az Arabidopsis transzformációja</i>	23
4.4.4	<i>Növények antibiotikum szelekciója.....</i>	23
4.4.5	<i>Luciferáz enzimaktivitás mérése.....</i>	24
4.4.6	<i>β-glükuronidáz (GUS) aktivitáson alapuló hisztokémiai enzimfestés.....</i>	24
4.4.7	<i>ADH enzim festés.....</i>	25
4.5	AZ INDUKÁLHATÓ ARABIDOPSIS CDNS KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE	25
4.5.1	<i>cDNS szintézise.....</i>	25
4.5.2	<i>A cDNS szálak vektorba klónozása</i>	27
4.6	AZ ADH1 PROMÓTER - LUCIFERÁZ RIPOTERGÉN KÉSZÍTÉSE.....	27
4.7	SZOFTVERES ALKALMAZÁSOK.....	28
5	EREDMÉNYEK	29
5.1	AZ INDUKÁLHATÓ ARABIDOPSIS CDNS KÖNYVTÁR.....	29
5.1.1	<i>A transzformáció kompetens cDNS könyvtár előállítás.....</i>	29
5.1.2	<i>A cDNS könyvtár jellemzése</i>	32
5.2	AZ ADH-LUC ARABIDOPSIS VONAL ELŐÁLLÍTÁSA	34
5.2.1	<i>Az ADH1-LUC riporter gén konstrukciója.....</i>	34
5.2.2	<i>Az ADH1-LUC független növényi vonalak tesztelése</i>	34
5.2.3	<i>Az ADH-LUC vonal luciferáz aktivitása stresszre indukálódik.....</i>	36
5.3	AZ ADH1-LUC RIPOTERGÉN TRANSZ-AKTIVÁCIÓ VIZSGÁLATA.....	37
5.3.1	<i>Megnövekedett ADH1-LUC aktivitást mutató vonalak azonosítása</i>	37
5.3.2	<i>Két vonal azonosítása ösztradiol függő luciferáz aktivitással.....</i>	38
5.4	AZ ADH/121 VONAL JELLEMZÉSE	39
5.4.1	<i>Az ADH/121 vonal luciferáz aktivitásának vizsgálata</i>	39
5.4.2	<i>Az ADH1 mRNS szintje megemelkedik ABS és ösztradiol kezelés hatására az ADH/121 vonalban</i>	41

5.4.3	<i>Az ADH1 enzim aktivitása megemelkedik ösztradiol kezelést követően az ADH/121 vonalban</i>	42
5.4.4	<i>Az ADH/121 vonal cDNS inszertjének azonosítása</i>	43
5.4.5	<i>A RAP2.12 fehérje az AP2/ERF transzkripció faktorok B-2 alcsaládjába tartozik</i>	43
5.4.6	<i>A RAP2.12 gén kifejeződése indukálható az ADH/121 vonalban</i>	45
5.4.7	<i>A RAP2.12 cDNS klónozása és növénybe transzformálása</i>	45
5.4.8	<i>A RAP2.12 transzkripció faktor és ADH1 promóter kölcsönhatásának vizsgálata</i>	46
5.4.9	<i>Az RAP2.2 és RAP2.3 transzkripció faktorok is indukálják az ADH1-LUC gént</i>	48
5.4.10	<i>A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 gének kifejeződésének szintje a különböző szövetekben illetve fejlődési állapotokban eltérő</i>	49
5.4.11	<i>A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 gének kifejeződésének szintje különböző hormon és stressz kezelések hatására</i>	51
6	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	52
6.1	RIPORTERGÉN TRANSZ-AKTIVÁLÁSON ALAPULÓ GENETIKAI RENDSZER KIDOLGOZÁSA	52
6.2	AZ ERF TÍPUSÚ TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK SZEREPE AZ ADH1 GÉN MŰKÖDÉS SZABÁLYOZÁSÁBAN	55
7	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	58
8	IRODALOMJEGYZÉK	59
9	ÖSSZEFOGLALÁS	71
10	SUMMARY	74
11	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	77
12	FÜGGELÉK	78

1 BEVEZETÉS

A kedvezőtlen környezeti körülmények hatására a mezőgazdasági növénytermesztés hatalmas károkat szenved minden évben. A környezeti stressz szempontjából a talaj magas sókoncentrációja vagyis a szikesedés, a szárazság, a téli vagy kora tavaszi fagyok miatti fagykár azok a tényezők, amik hazánkban legnagyobb környezeti problémát jelentik. A hideg, a szárazság illetve a só stressz közös élettani károsodást is jelent, ami sejt szinten ozmotikus stresszként jelentkezik. A növények egy összetett védekezési mechanizmussal rendelkeznek, hogy megbirkózzanak az ozmotikus stressz okozta károsodásokkal. A stressz érzékelését követően összehangolt jelátviteli hálózatok aktiválódnak, ezek génkifejeződés változásokat hoznak létre, amelyek biokémiai és fiziológiai válaszok formájában fejeződik ki. A stressz érzékelés és a jelátvitel komplexitása bonyolulttá teszi ezen mechanizmusok és kapcsolataik megértését.

Kutatócsoportunk az ozmotikus stressz választ és az az elleni védelmi reakciókat tanulmányozza a magasabb rendű növények szintjén, genetikai modellként a széleskörben alkalmazott keresztesvirágú *Arabidopsis thaliana* fajt alkalmazva. Egy riportergén aktiváción alapuló genetikai rendszert dolgoztunk ki, amely alkalmas a környezeti stresszhez kapcsolt jelátvitel ez idáig ismeretlen szabályozó elemeinek azonosítására.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 NÖVÉNYI STRESSZ VÁLASZOK OZMOTIKUS STRESSZ SORÁN

A növények gyakran ki vannak téve stresszhatásoknak, amelyek hátrányosan befolyásolják a növekedésüket, fejlődésüket és termőképességüket. A stressz tényezők lehetnek biotikusak, amiket más élő szervezetek okoznak és abiotikusak, amiket a megváltozott fizikai vagy kémiai környezet idéz elő. A stressz a növényi sejtben a válaszok sokaságát váltja ki, amik megváltoztatják a génkifejeződés mintázatát és az anyagcsere folyamatokat, és ezek a növény növekedésére és fejlődésére is kihatással lesznek. Azt, hogy a növény hogyan fog válaszolni a stresszre, meghatározza a stressz időtartama és mértéke, de szintén fontos tényezők a növény genetikai adottságai vagy fejlődési állapota stb. A stressz válasz általános funkciója az, hogy lehetővé tegye a növény számára a kedvezőtlen hatásokhoz való alkalmazkodást, a növény túlélését. A mechanizmus bonyolultsága miatt a növényi stressz válasz számos elemének szerepe még nem tisztázott.

Az abiotikus stresszre adott növényi válaszok közül, leginkább a szárazságra, a talaj magas sókoncentrációja által kiváltott só stresszre, és az alacsony hőmérséklet (de nem fagyás) által kiváltott hideg stresszre adott válaszokat tanulmányozták. Mindhárom hatás hiperozmolaritást idéz elő, megváltoztatja a növényi sejt citoplazmájának ion összetételét, károsítja a biológiai membránokat. E stressz tényezőknek más hatásuk is lehet, pl. magas só tartalmú talajon a Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} ionok toxikus koncentrációban felhalmozódhatnak a citoplazmában. (Munns és Tester, 2008). A hiperozmolaritás másodlagos stresszeket is generálhat, ilyen az oxidatív stressz, amit a felszaporodott reaktív oxigén formák (ROS) okoznak. A ROS rendszerint normális sejt aktivitás következtében is képződik (fotorespiráció vagy zsírsavak β -oxidációja) de a szintjük emelkedhet amikor a növényeket biotikus vagy abiotikus stressz éri (Mittler, 2002).

Az ozmotikus stressz érzékelését követően a növényi sejtben belül komplex jelátviteli folyamat indul, ami számos célgén aktivitásának megváltozását idézi elő, ezek

arra irányulnak, hogy a növény ellenálljon. A vízpotenciál csökkenése sokszor még visszafordítható az ozmotikus viszonyok szabályozásával, sok növény szerves ozmolitokat képes felhalmozni a citoplazmájában. A glicin-betain, mannitol, szorbitol, prolin stb. ozmoprotektánsok, az ozmotikus különbséget próbálják fenntartani a citoplazma és az extracelluláris tér között, de nem zavarják a sejt funkciókat. Az ozmolitok felhalmozódása mellett, enzimatis antioxiánsok és speciális növényi fehérjék kifejeződése fokozódik, ilyenek a hidrófil karakterű LEA fehérjék (late embryogenesis abundant), aquaporinok, különböző chaperonok és patogenezishez kapcsolt fehérjék (Bray és mtsai, 2000). Ezen gének termékei segíthetnek a növénynek, hogy alkalmazkodjon, túléljen vagy „túltegye” magát a kedvezőtlen körülményeken.

A stressz válaszok szabályozásában részt vesznek a növényi hormonok, a legfontosabb megemlíteni az abszcizinsavat (ABS). Az ozmotikus stressz hatására az ABS felhalmozódik a szövetekben (Bray, 1993; Zhu, 2002). Az ABS felhalmozódása kulcsszerepet játszik a stressz adaptációért felelős folyamatok szabályozásában, pl. a gázcsere nyílások zárósejt működésének szabályozása (Schroeder és mtsai, 2001; Zhang, 1991), de hatással van a hajtás és a gyökér növekedésére (Sharp és LeNoble, 2002), vagy az ozmolitok, mint a prolin felhalmozódására (Strizhov és mtsai, 1997). Az ABS génkifejeződés változások előidézéseért is felelős (Bray, 1993; Hirayama és mtsai, 1997; Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Az etilén (C_2H_4) egy gáznemű növényi hormon számos fejlődési folyamatban és stressz válaszban részt vesz. Fontos szerepe van a csírázási folyamatokban, sejt sors kialakításában, a nem meghatározásban, gyümölcserésben, a virág szenszcenciában, levél leválásban és fontos a patogén fertőzés és sebzés elleni válaszreakciókban (Johnson és Ecker, 1998). Az etilén jelátvitel összefüggésbe hozható a só stressz által kiváltott válaszokkal, valamint részt vesz a só tolerancia kialakításában is (Cao és mtsai, 2006; Cao és mtsai, 2008).

2.1.1 A stressz érzékelése

Az abiotikus stressz elsődleges érzékelésének mechanizmusa még nem tisztázott. Valószínűleg a stressz típusától függően a stressz érzékelését a plazmamembrán különböző receptorai végzik, a jel továbbítódik és másodlagos hírvivők Ca^{2+} , inozitol foszfátok és reaktív oxigén formák (ROS) mennyiségének növekedését idézi elő. A

baktériumok az ozmotikus viszonyok megváltozását a két-komponensű hisztidin-kináz szignál átviteli rendszerrel érzékelik, ami egy mechanikus érzékelő és egy válasz-szabályzó fehérjéből áll (Parkinson és Kofoed, 1992). Az élesztőben ugyanezt, a bakteriális két-komponensű rendszerből származtatható Sln1p-Ssk1p végzi. Az ozmoszenzorként működő Sln1p transzmembrán fehérje, tartalmaz egy extracelluláris érzékelő-, egy citoplazmatikus hisztidin-kináz-, és egy foszfát fogadó domént. Az Sln1p vízvesztés hatására egy többlépéses foszfortranszfer reakción keresztül aktiválja a citoplazmatikus Ssk1p válasz-szabályzó fehérjét, ami a HOG1 MAP-kináz kaszkádot szabályozza (Posas és mtsai, 1996). Dehidratált Arabidopsis növényekből izoláltak egy feltételezett ozmoszenzort, a hibrid Hisztidin-kináz 1-et (AtHK1), ami a két transzmembrán és egy hisztidin-kináz doménje mellett, tartalmazza a válasz-szabályzó domént is. Az AtHK1 fehérjét sln1 mutáns élesztőben túltermelve sikerült szuppresszálniuk az élesztő letalitását (Urao és mtsai, 1999). Az AtHK1 az ozmotikus stressz jelátvitel, csírázás és növekedés pozitív szabályzója, viszont a vele homológiát mutató citokinin receptor fehérjéről (AHK2, AHK3 és CRE1) kiderült, hogy az ozmotikus stressz negatív szabályzásában vesznek részt (Heyl és Schmulling, 2003; Tran és mtsai, 2007).

Az etilén hormon érzékelését szintén hibrid hisztidin-kináz típusú receptorok végzik, ezek transzmembrán doménje az etilén kötésére képes. Az etilén receptor hisztidin-kinázok két csoportra oszthatók. Arabidopsisban az 1-es típusú etilén receptorok közé tartozik az ETR1 és ERS1 fehérje, ezek tartalmazzák az ismert érzékelő, hisztidin-kináz és válasz szabályzó doméneket, viszont a 2-es típusú receptorok (ETR2, ERS2 és EIN4) hisztidin-kináz doménje degenerált. Az etilén receptor fehérjékre jellemző, hogy tartalmazznak egy ún. GAF domént is, mellyel olyan kis molekulákat tudnak megkötni mint pl. a cGMP. (Schaller, 2002). Az etilén receptorok részt vesznek a stressz válaszokban, ezt támasztja alá az, hogy a dohány 2-es típusú etilén receptora az NtHK1, só- és ozmotikus stressz valamint sebzés hatására is indukálódik (Zhang, 2001).

A növényi G-proteinek fontos szerepet töltenek be különböző hormonok fogadásában és ion csatornák szabályozásában, feltételezhető bizonyos G-protein kapcsolt receptorok jelentősége a stressz érzékelésében (Chen és mtsai, 2004).

2.1.2 Másodlagos jelátviteli mechanizmusok ozmotikus stressz válasz során

A stressz elsődleges érzékelése után a szenzorok foszforiláción és defoszforiláción alapuló jelátviteli kaszkádokat indítanak el. A fehérje kinázok és foszfatázok génjei általában a különböző stresszhatások által aktiválódnak (Lee és mtsai, 1999; Luan, 1998). A stressz válaszok során bekövetkező foszforilációs lépéseket sok esetben az SnRK (sucrose non-fermenting related kinase) fehérje család tagjai végzik.

Egy korai esemény ami a vízvesztés, a só és alacsony hőmérséklet által kiváltott stressz érzékelését követi a citoplazma Ca^{2+} szintjének megemelkedése. A megnövekedett Ca^{2+} szintet a kalcium-kötő fehérjék érzékelik, konformációjuk a Ca^{2+} -tól függően megváltozik és így kapcsolatba tudnak lépni a megfelelő kölcsönható partnerrel. Típusosan ilyen „kalcium-szenzorok” a kalmodulin, a kalcium-függő fehérje kinázok (CDPK) és a Ca^{2+} szabályozott protein foszfatázok. Több publikáció is beszámolt arról, hogy különböző abiotikus stressz érzékelését követően bizonyos növényi kalmodulinok vagy CDPK-k aktiválódnak (Braam és Davis, 1990; Harding és mtsai, 1997; Saijo és mtsai, 2000; Urao és mtsai, 1994).

A kalcium-függő fehérjék közé tartozik a SOS3 (salt overly sensitive), ami létfontosságú az Arabidopsis só-indukálta Ca^{2+} jelátvitelében és a só tolerancia kialakításában. A SOS3 egy membrán asszociált fehérje 3 citoplazmatikus Ca^{2+} kötő EF-karral, aminosav szekvenciája hasonlóságot mutat az élesztő Ca^{2+} /kalmodulin-függő fehérje foszfatáz, a kalcineurin B-alegységével és állati neuronális Ca^{2+} szenzorokkal (Ishitani, 2000). A megemelkedett Ca^{2+} szint hatására az SOS3 kölcsönhatásba lép a SOS2-vel, ami egy SnRK3 családba tartozó protein kináz (Halfter és mtsai, 2000). Az SOS2-SOS3 kináz komplex foszforilálja a hosszú citoplazmatikus nyúlvánnyal rendelkező transzmembrán SOS1 Na^+/H^+ antiporter fehérjét (Qiu és mtsai, 2002). A SOS1 fehérje fontos komponense a sejt Na^+ és K^+ homeosztázisának (Shi és mtsai, 2000).

Egy másik kalcineurin-B típusú fehérje az Arabidopsis CBL1 foszfatáz, alacsony hőmérséklet, só és szárazság hatására egyaránt indukálódik, de különböző módon szabályozza a stressz válaszokat: a szárazság és só stressz válaszoknak pozitív, a hideg stressz válaszoknak negatív szabályozója (Cheong és mtsai, 2003). A CBL típusú fehérjék mai ismereteink szerint kizárólag SnRK3 kinázokkal lépnek kölcsönhatásba, Ca^{2+} közvetítette módon (Luan és mtsai, 2002).

Az ABI1 és ABI2 PP2C típusú foszfatázok közvetlenül az ABS érzékelését követő jelátvitel negatív szabályzói, az SnRK2 protein kinázok autofoszforylációjának gátlásáért felelősek (Merlot és mtsai, 2001; Yoshida és mtsai, 2006). A közelmúltban azonosított START funkcionális domént tartalmazó PYL1 fehérje ABS receptorként működik. Az ABS koncentrációjának növekedésével a PYL1 ABS-t köt, és ennek következtében konformáció változáson megy keresztül. A megváltozott konformációjú PYL1 az ABI1 foszfatáz aktív helyéhez tud kötődni és ezáltal megakadályozza annak működését, tehát az SnRK2 kinázok aktív állapotba kerülnek (Miyazono és mtsai, 2009). Az SnRK2 kinázok az ozmotikus stressz válaszokban az ABS közvetített jelátvitel legfontosabb pozitív szabályzói, olyan transzkripciós faktorokat aktiválnak, melyek stressz válasz gének kifejeződéséért felelősek (Fujita, 2009).

Az abiotikus stressz jelátvitel közvetítésében fontos szerepük van a MAP-kináz (mitogen-activated protein) kaszkádoknak. Az Arabidopsis mellett lucernában és dohányban is azonosítottak különböző stressz hatásokra indukálódó MAP-kinázokat. Valószínűsíthető, hogy az Arabidopsis AtHK1 ozmoszenzor az élesztő mintájára egy MAP-kináz kaszkádot aktivál (Ligterink és Hirt, 2001; Mikolajczyk és mtsai, 2000; Munnik és mtsai, 2000).

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a foszfolipidek is részt vesznek az abiotikus stressz válaszokban. A foszfolipid közvetítette jelátvitel másodlagos hírvivői, az inozitol-trifoszfát (IP_3), diacil-glicerol (DAG), foszfatidsav (PA) stb. tovább fokozhatják az intracelluláris Ca^{2+} szintet vagy MAP-kináz kaszkádokat aktiválhatnak (Hirayama és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 2001; Mikami és mtsai, 1998; Munnik és mtsai, 2000; Wu és mtsai, 1997; Xiong és mtsai, 2001; Zhu, 2002).

A növényekben abiotikus stressz hatására reaktív oxigén fajták (ROS) halmozódnak fel. A ROS magába foglalja a hidrogén peroxidot (H_2O_2), hidroxil gyököket és szuperoxid anionokat. Az H_2O_2 élesztőben, állatokban és növényekben is képes MAPK kaszkádok aktiválására, feltételezhetően úgy, hogy a tirozin-foszfatázok konzervált cisztein oldalláncát oxidálja, aminek hatására a receptor-tirozin kinázok aktivált állapotba kerülnek (Kovtun és mtsai, 2000; Rhee és mtsai, 2000; Singh, 2000).

2.1.3 Az ABS szerepe a stressz válaszokban

Az ABS hormon szerepet játszik a növény bizonyos növekedési és fejlődésbeli folyamataiban, azonban fő funkciója az abiotikus (és részben biotikus) stressz válaszok szabályozásában van. A stressz jelátviteli folyamatokban az ABS felhalmozódásáért az ABS bioszintézis enzimeinek gén aktiválódása és a lebontó fehérjék génjeinek gátlása felelős (Finkelstein, 2002). Az ABS bioszintézis bizonyos lépéseit szabályozó fehérjék génjei multi-gén családokba tartoznak. Egy adott géncsalád tagjai általában ugyanazt a funkciót látják el, de aktiválódásuk különböző stresszhatásokra vagy különböző fejlődésbeli állapotokban történhet, vagy éppen az ABS bioszintézis szerv és szövetek specificitását biztosítják (Finkelstein, 2002). Az ABS bioszintézis enzimeinek azonosítása dohány, kukorica, paradicsom és *Arabidopsis* ABS-hiányos mutánsainak (*aba1*, *aba2*, *vp14*, *nced*, *aa0*) genetikai analízisével történt (Bittner és mtsai, 2001; Duckham, 1990; Iuchi és mtsai, 2000; Marin és mtsai, 1996; Neill, 1998; Schwartz és mtsai, 1997; Seo és mtsai, 2000).

Arabidopsis-ban két folyamatot azonosítottak, melyek az ABS lebontásáért felelősek. Oxidatív típusú katabolizmus az ABS 8'-hidroxilációja, melyet a citokróm CYP707A család fehérjéi végeznek (Umezawa és mtsai, 2006). Az ABS szénhidrát-konjugátumok képződésével is inaktiválódhat, aminek mechanizmusa még nem tisztázott. Azonosítottak egy *Arabidopsis* mutánst, melyben az ABA inaktív állapotban maradt stressz körülmények között is. A *BGI* gén terméke egy β -glükozidáz, ozmotikus stresszre indukálódik és az ABS-t felszabadítja a konjugátumaiból (Lee és mtsai, 2006).

Az ABS egyik fontos élettani hatása a mag nyugalmi állapotának fenntartása, ez biztosítja azt, hogy a mag ne csírázzon ki kedvezőtlen körülmények között. Másik fontos hatása az, hogy a csírázást követően feltartóztathatja a csíranövények növekedését, amíg a körülmények nem javulnak (Lopez-Molina és mtsai, 2001). A növény fejlődésének későbbi szakaszaiban az ABS főleg a stressz válaszok szabályozásában vesz részt, fontos a gázcsere nyílások működésében betöltött szerepe. Az ABS jelátviteli folyamatainak megértésében, főleg olyan *Arabidopsis* mutánsok tanulmányozása segített, melyek érzéketlenek az ABS csírázás vagy csírázás utáni növekedés gátló hatására. Az ABS érzéketlen mutánsok (*abi1*, *abi2*, *abi3*) jellemzése segített azonosítani nemcsak a mag csírázásának, de a zárósejt működés szabályozásának jelátviteli komponenseit is (Assmann, 2003; Finkelstein és mtsai, 2002). Az ABI1 és ABI2 fehérjék PP2C

szerin/treonin protein foszfatázok, az ABS jelátvitel negatív szabályzói a mag nyugalmi állapotában és a csírázásban (Leung és mtsai, 1994; Rodriguez és mtsai, 1998). Ezek a foszfatázok a zárósejtek ABS közvetítette jelátvitelében is részt vesznek (Allen és mtsai, 1999). Az Arabidopsis genom 76 PP2C típusú gént kódol és ezek közül már további 4-ről derült ki (*AHG3*, *HAB1*, *HAB2*, *AHG1*), hogy részt vesz az ABS jelátvitel negatív szabályozásában (Hirayama és Shinozaki, 2007). Az „ABS érzéketlen” transzkripciós faktorok ABI3, ABI4 és ABI5 pozitívan szabályozzák az ABS jelátvitelt a csírázás során. Az ABI3 egy B3 doménnel rendelkező transzkripciós faktor, kulcs szerepe van az embriogenezisben, az ABI4 egy AP2/ERF típusú, az ABI5 egy bZIP típusú transzkripciós faktor, ezek főleg a mag csírázás és csíranövény fejlődésében játszanak szerepet (Finkelstein és mtsai, 2002; Giraudat és mtsai, 1992).

2.1.4 A génkifejeződés változásai ozmotikus stressz során

Az ozmotikus stressz érzékelését követő jelátviteli folyamatok végső soron génkifejeződés változásokat idéznek elő. A génkifejeződés változások időbeni lefutásukat tekintve korai vagy késői válaszokra csoportosíthatóak. A korai válasz gének a stressz érzékelését követő percekben belül indukálódnak és rövid ideig, átmenetileg működnek, néhány óra múlva aktivitásuk csökkenni kezd. Ezek a gének főleg transzkripciós faktorokat és más szabályzó fehérjéket kódolnak. A stressz válasz gének másik csoportja lassan és fokozatosan aktiválódik, akár órákkal a stressz érzékelése után és működésük sokáig aktív marad. Ide tartoznak a legfontosabb stressz válasz és alkalmazkodásért felelős gének (Zhu, 2002).

A szárazság és magas só koncentráció által kiváltott génkifejeződés változások történhetnek ABS-függő és ABS-független módon is, ugyanakkor a hideg hatására főleg ABS-független génkifejeződés változások játszódnak le (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Az ABS közvetítette jelátviteli utakban számos stressz adaptációért felelős gén kifejeződése aktiválódik, ilyenek pl. az aquaporinok vagy az ozmoprotektánsok bioszintézisének enzimei (Parent és mtsai, 2009; Strizhov és mtsai, 1997).

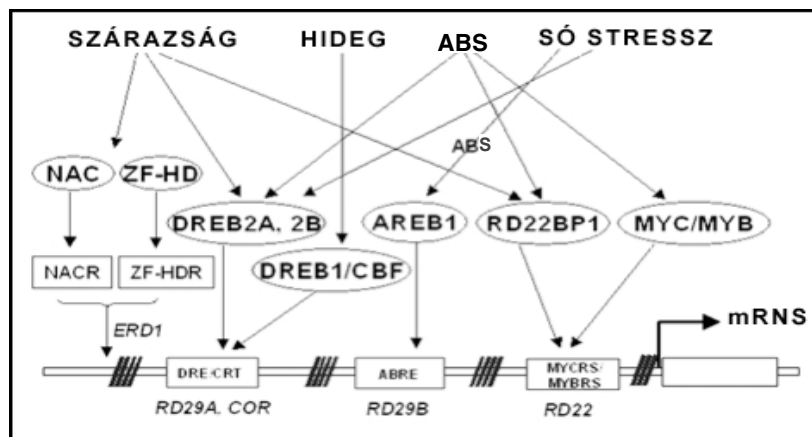
Két fontos, szárazságra indukálódó stressz válasz gént azonosítottak Arabidopsisban, melyek egymás mellett helyezkednek el a genomban. Az *RD29A* és *RD29B* (responsive to dessication) gének aktivitását a dehidratáció, alacsony

hőmérséklet, magas sókoncentráció vagy ABS kezelés különböző módon indukálja. Az *RD29A* és *RD29B* promótereinek tanulmányozása során több transzkripció faktor kötő motívumot is azonosítottak, amelyek részben megegyeztek a két promóteren (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994). Számos ABS-függő stressz válasz gén promótere tartalmaz egy jellegzetes szekvencia motívumot az ABRE (ABA response element) elemet (CACGTGGC). Ehhez az ABRE elemhez bázikus leucin zipper (bZIP) transzkripció faktorok képesek specifikusan kötődni (Guiltinan és mtsai, 1990). Az ABS-függő stressz válasz gén, az *RD29B* promóterén azonosították ezt az ABRE motívumot, ehhez dehidratáció és só stressz következtében a bZIP típusú AREB1, AREB2 és AREB3 transzkripció faktorokat kötődnek és aktiválják az *RD29B* működését (Uno és mtsai, 2000). Az AREB transzkripció faktorok túltermelése ABS-érzékenységet és megnövekedett szárazság toleranciát idézett elő Arabidopsisban (Kang és mtsai, 2002). Bebizonyosodott, hogy az AREB transzkripció faktorok ABS közvetítette aktiválásához, az SNRK2 kinázok általi foszforiláció szükséges (Fujii és mtsai, 2007).

Az *RD29A* gén dehidratációra, alacsony hőmérsékletre és ABS kezelésre aktiválódik. A promótere tartalmazza az ABS közvetített stressz válaszáért felelős ABRE elemet, de emellett egy másik konzervált szekvencia motívumot a DRE (drought-responsive element) elemet (TACCGACAT) is. A DRE elem főleg a dehidratáció, a sóstressz és hideg hatására létrejövő gyors gén aktivációt biztosítja, de nincs köze az ABS közvetítette válaszokhoz (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994). A DRE elem megtalálható más dehidratáció és hideg indukált gének promóter régiójában is (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Thomashow, 1999). Egy nagyon hasonló motívumot azonosítottak a hidegre indukálódó *COR15A* (*COLD-REGULATED 15A*) gén promóterén. A CRT (C-repeat) elem (A/GCCGAC) a DRE motívum egy részét tartalmazza (Stockinger és mtsai, 1997).

Élesztő egyhibrid szűréssel azonosították a DRE helyhez specifikusan kötő DREB1 és DREB2 AP2/ERF típusú transzkripció faktorokat és kiderült, hogy a CRT elemhez szintén a DREB1 (CBF) transzkripció faktor kötődik (Liu és mtsai, 1998; Stockinger és mtsai, 1997). Az Arabidopsisban 3 gén kódolja a DREB1-et (*DREB1A*, *DREB1B*, *DREB1C*), és 2 a DREB2 fehérjét (*DREB2A* és *DREB2B*) (Agarwal és mtsai, 2006). A *DREB1/CBF* gének kifejeződését a hideg indukálja, de dehidratáció és só nem, viszont a *DREB2* géneket a dehidratáció és sóstressz aktiválja, a hideg nem (Liu és mtsai, 1998) (1. ábra).

Az ozmotikus stresszre indukálódó késői válaszgén az Arabidopsisban azonosított *RD22* indukciója ABS által közvetítődik. Egy bHLH-bZIP és egy MYB típusú transzkripciós faktor a MYC2 és MYB2 együtt kötődik az *RD22* promóter elemeihez és aktiválják az *RD22* gén kifejeződését. A MYC2 és MYB2 fehérje az endogén ABS felhalmozódását követően szintetizálódik, szerepük a késői stressz válaszokban van (Abe és mtsai, 1997). Mindkét transzkripciós faktor kötödni képes az Arabidopsis *alkohol dehidrogenáz 1 (ADH1)* gén és más ABS és jázmonsav indukálható gének promóteréhez is (Abe és mtsai, 2003).



1. ábra. A szárazság, hideg és sóstressz által kiváltott génkifejeződés transzkripcionális szabályozása (Tuteja, 2007).

Az elipszisek a transzkripciós faktorokat, a téglalapok a konzervált promóter elemeket jelölik. További magyarázat a szövegben.

Az Arabidopsis növények dehidratálását követő 1. órában megemelkedik egy korai stressz válasz gén az *ERD1* mRNS szintje. Az *ERD1* egy ún. Clp proteáz szabályozó alegységét kódolja, aminek a kloroplasztisz target tranzit szabályozásában van szerepe. Az *ERD1* még az ABS felhalmozódás előtt aktiválódik só stressz és dehidratáció hatására (Nakashima és mtsai, 1997). Azonosítottak egy transzkripciós faktor családot, melyek egy konzervált NAC DNS-kötő domént tartalmaztak és az *ERD1* promóter specifikus régiójához tudtak kötödni (NACR - NAC felismerő szekvencia) (Tran és mtsai, 2004). A NAC fehérjék túltermelése önmagában nem idézte elő az *ERD1* aktivációját, ehhez ugyanis egy másik transzkripciós faktor, a „zinc-finger” típusú ZF-HD fehérjék is szükségesek. A ZF-HD1 egy specifikus szekvencia motívumon keresztül kötődik az *ERD1* promóterhez (ZF-HD felismerő szekvencia)(1.ábra). A NAC és ZF-HD1 fehérjék együttes túltermelése nagymértékben fokozta az Arabidopsis növények

szárazság toleranciáját. A különböző stressz jelátviteli utak szabályozása kapcsolódik egymáshoz (cross-talk), és ebben a génkifejeződést szabályozó promóter motívumok fontos szerepet játszanak, genetikai analízisek bizonyítják, hogy nincs élesen meghúzható határ az ABS függő és független jelátvitel között (Kizis és mtsai, 2001)

2.1.5 A stressz válaszok epigenetikus szabályozása

A gén csendesítés egy epigenetikus mechanizmus, ami a gének aktivitását szabályozza a transzkripció vagy poszt-transzkripcionális szinten. Eddigi ismereteink szerint növényekben a gén csendesítés miRNS, siRNS, DNS metiláció vagy hiszton módosítás által történik. (Baulcombe, 2004). Egy a stressz válaszok epigenetikus szabályozásáért felelős rendszert tártak fel Arabidopsisban. Az RPA2 és AGO6 fehérjék az *RD29A* stressz válasz gén promóterének DNS metilációjáért felelősek, ami a promóter működését inaktíválja (Kapoor és mtsai, 2005; Zheng és mtsai, 2007). Azonosítottak egy metilcitozin-DNS-glikoziláz fehérjét kódoló gént az *ROS1*-t, melynek hiányában az *RD29A* promóter régiója DNS hipermetilált állapotba kerül. Ebben az állapotában sem az ABS kezelés, sem az ozmotikus stressz nem tudja előidézni az *RD29A* promóter működését. A *ROS1* gén funkciója az, hogy elnyomja a transzkripcionális gén csendesítést úgy, hogy demetilálja a cél gén promóterének DNS-ét (Gong és mtsai, 2002). Azonosították a *ROS1* DNS demetilációjának szekvencia specifikusságát biztosító fehérjét, a *ROS3*-at, ami egy speciális motívumával rövid RNS kötésére képes. Valószínűsíthető, hogy a rövid RNS-t kötött *ROS3* közvetíti a *ROS1* általi DNS demetilációt (Zheng és mtsai, 2008).

Az eukarióta gén aktivitás szabályozásában fontos szerepe van a hiszton acetilációjának. A mutagenizált *RD29A*-LUC vonalak között azonosították egy különböző stressz válaszokra megemelkedett szintű riporter gén aktivitást mutató vonalat. A mutáció a WD40 típusú *HOS15* gént érintette, amely a hiszton acetiláció szabályozásában játszik szerepet. Kimutatták, hogy a *HOS15* fehérje kölcsönhatásra képes a H4 hisztonnal és csökkenti annak acetilációját. A *hos15* mutáns hiperszenzitív volt a hidegre is (Zhu és mtsai, 2008).

2.2 GENETIKAI STRATÉGIÁK ALKALMAZÁSA AZ ABIOTIKUS STRESSZ VÁLASZ SZABÁLYZÓ GÉNEK AZONOSÍTÁSÁRA

2.2.1 Klasszikus mutagenézis és mutáns azonosítás

A molekuláris genetika első széleskörben alkalmazott módszerei gének azonosítására az ún. klasszikus mutagenézisen alapultak. Eleinte uretánon, nitrozoureán majd etilmetánszulfonáton (EMS) alapuló kémiai mutagenézissel idéztek elő pont-mutációkat, ami a növény genetikai variációját hozta létre és ez által bizonyos fenotípust okozhatott. A fizikai mutagenézishez használt röntgen sugárzás vagy a sokkal hatékonyabb gyors neutron sugárzás ionizációs hatása kisméretű DNS lánc deléciókat idéz elő (Feldmann, 1994; Rédei, 1992).

Stressz válasz gének mutációinak azonosításához rendszerint a mutagenizált növények M2 generációjának megváltozott stressz toleranciáját vizsgálják. A gének azonosítása általában hosszadalmas térképalapú klónozással vagy DNS-*microarray* technológiához kötött DNS mutáció térképezéssel történik. EMS mutagenizált *Arabidopsis* magokkal végzett genetikai szűréssel sóra nagyon érzékeny (hiperszenzitív) mutánsokat azonosítottak (Wu és mtsai, 1996). Ez a kísérlet vezetett a növényi sejt ion homeosztázisát szabályzó SOS (Salt Overly Sensitive) út felfedezéséhez (Ishitani, 2000; Liu, 2000; Shi és mtsai, 2000). Zhu és munkatársainak egy alternatív stratégiája az volt, amikor az *RD29A* promóterhez kapcsolt szentjánosbogár luciferáz riportergént túltermelő vonalat használták EMS mutagenézishez és megváltozott luciferáz tevékenységet mutató mutánsokat kerestek (Ishitani és mtsai, 1997). A megnövekedett biolumineszcenciájú mutáns vonalak analízisével az inozitol-trifoszfát (IP3) kódoló *FRY1* gént, és a hiszton deacetiláz *HOS15* gént (Xiong és mtsai, 2001; Zhu és mtsai, 2008). A stressz válaszokra csökkent riportergén aktivitást mutató vonalak vizsgálata vezetett a DNS demetilációban szerepet játszó *HOS15* gén azonosításához (Zhu és mtsai, 2008).

2.2.2 Inszerciós mutagenézis

Az inszerciós mutagenézis során, néhány ezer bázispár DNS fragment épül be a növény genomjába, ami elronthatja egyes gének szekvenciáját, így funkciójuk elvesztését okozhatja. Az inszercióhoz használnak mobilis genetikai elemeket, mint az Ac/DS vagy En/I típusú transzpozonok (Martienssen, 1998). Az *Agrobacterium tumefaciens* egy Gram negatív talaj baktérium, ami képes a Ti-plazmidjának egy részét (T-DNS) bejuttatni és kovalensen beépíteni a fertőzött gazdasejt genomi DNS-ébe. A T-DNS integrációja a gazdasejt genomjába ún. illegitim rekombináción alapul, ami azt jelenti, hogy nem igényel szekvencia homológiát a növény genomi régiójával. A T-DNS inszerciós mutagenézis funkció veszteses mutációt okoz (Zupan és Zambryski, 1995). A stressz gének azonosítása céljából általában nagyszámú inszerciós mutánst állítanak elő és a következő generációt vizsgálják megváltozott fenotípusra. Az inszerció helyének azonosítása a T-DNS melletti régió PCR amplifikálásával történik.

Példaként lehet említeni az Arabidopsis *sto1* mutáns izolálását. Ezt a mutánst Arabidopsis növények inszerciós mutagenézisét követően azonosítottak, mivel só és szorbitol tartalmú táptalajon megnövekedett csírázási képességet mutatott. A *sto1* mutánsban az inszerció az ABS bioszintézis kulcsenzimének az *NCED3*-nak a génjét inaktiválta (Ruggiero és mtsai, 2004).

2.2.3 Gén csapdázás

A gén vagy promóter csapdázás azon az elven alapul, hogy T-DNS segítségével vagy transzpozonokkal promóter nélküli riportergéneket jutattak a növényi genomba, amelyek *in situ* fúziókat hozhatnak létre a növényi promóter és a riportergének között. Ezek könnyen azonosíthatóak a különböző növényi szervekben kifejeződő reporter enzimek aktivitásának vizsgálatával. Az enhanszer csapdák olyan konstrukciók ahol a riportergének minimális promóter elemekkel vannak összeépítve, a riportergén aktivációját a növényi genomban található enhanszer szekvenciák végzik. A riportergéneket T-DNS vagy transzpozon inszerció módszerével juttatják a növénybe. A növényi promóter csapdázást először dohányban és Arabidopsisban alkalmazták a promóter nélküli kanamicin foszfortranszferáz (*nptII*) és β -glükuronidázt riportergéneket (GUS) alkalmazva (Koncz és mtsai, 1989; Teeri és mtsai, 1986). Ac/Ds transzpozon

közvetítette gén csapdázással, promóterek és enhanszerek szövet specifikus működését vizsgálták rizsben és árpában (Chin és mtsai, 1999; Lazarow és Lutticke, 2009). Több tanulmány számolt be arról, hogy bakteriális (LUX) vagy szentjánosbogár (LUC) luciferáz riporter rendszert használtak random promóter és gén csapdázásos kísérletekben paradicsomban, Arabidopsisban és banánban (Meissner és mtsai, 2000; Remy és mtsai, 2005; Yamamoto és mtsai, 2003).

Transzpozon közvetítette Ds-GUS riporter gént használtak Arabidopsis promóter csapdázáshoz. Az utódok riporter gén aktivitását vizsgálták oxigén hiányos körülmények között, 65 vonalat azonosítottak, melyben a GUS aktivitás megnövekedett. Ezek között főleg szabályzó-, enzimátikus-, putatív receptor szerű kináz- és putatív szenzor hisztidin-kináz fehérjéket azonosítottak (Baxter-Burrell és mtsai, 2003).

2.2.4 Aktiváció-jelölés

Az aktiváció-jelölés Arabidopsisban különlegesen kialakított T-DNS vektorokkal történik, amelyek erős, többszörös konstitutív enhanszereket tartalmaznak közel az integrációs helyhez. A T-DNS kromoszómába épülése után az enhanszer elemek aktiválhatják a szomszédos gének transzkripcióját, és azok megnövekedett ektopikus kifejeződése domináns, konstitutív megváltozott fenotípust eredményezhet. Ahhoz, hogy aktiváljunk egy növényi gént a T-DNS-nek egy gén szomszédságába és nem a kódoló régiójába kell beépülnie, méghozzá jó orientációban. A módszer hátránya, hogy az enhanszer elemek számos gént is aktiválhatnak az inszerció szomszédságában, és ez egy összetett megváltozott fenotípushoz vezethet (Nakazawa és mtsai, 2003). Az aktiváció-jelöléssel funkció-nyeréssel mutációk idézhetők elő. Aktiváció-jelöléssel azonosították a hibrid hisztidin-kináz homológ CKII citokinin receptort, melynek konstitutív aktivációja felgyorsult sejtosztódást és hajtásnövekedést idézett elő szövetkultúrában, exogén citokinin hozzáadása nélkül (Kakimoto, 1996). A PR-1::luciferáz riporter gén konstrukciót tartalmazó Arabidopsis növényeken végzett aktiváció-jelöléssel mutagenézissel számos megnövekedett lumineszcenciájú növényt találtak. Az egyik mutáns jellemzése során azonosították a fenotípust okozó *ADR1* patogén rezisztencia gént, ebben a növényben a kulcsfontosságú biotikus rezisztencia gének konstitutív kifejeződését írták le (Grant és mtsai, 2003).

2.2.5 cDNS könyvtár transzformáció

Egy hatékony módszer funkció-nyeréses fenotípusok keresésére a random cDNS túltermelés. Az RNS eredetű komplementer DNS (cDNS) szálakat növényi expressziós vektorba klónozzák, azután bejuttatják a növény genomjába. Ehhez általában olyan vektort használnak, aminek az expressziós kazettája a CaMV35S promóter szabályozása alatt áll, és ez a cDNS-ek magas szintű, konstitutív kifejeződését biztosítja. A véletlenszerűen beépülő cDNS klónok túltermelése, olyan domináns fenotípushoz vezethet, amit megfelelő genetikai szűréssel azonosítani lehet. Az egyik első ilyen kísérletben konstitutív promóter mögé klónozott cDNS könyvtárat használtak transzgenikus *Arabidopsis* növények előállítására, és a fejlődési rendellenességeket mutató növények azonosítására (LeClere és Bartel, 2001). Egy cDNS könyvtár *Arabidopsis* gyökerekbe transzformálásával azonosították az *ESR1* (*Enhancer of Shoot Regeneration 1*) gént, az *ESR1* cDNS-ének túltermelése a gyökér explantátumok citokinin-független regenerálódását idézte elő (Banno és mtsai, 2001). A „FOX” rendszerben a RIKEN *Arabidopsis* cDNS kollekció 10 000 független, teljes hosszúságú cDNS-ből készítettek egy normalizált, teljes-hosszúságú cDNS könyvtárat, és nagyszámú morfológiai mutánst sikerült előállítaniuk (Ichikawa és mtsai, 2006; Seki és mtsai, 2002). A FOX rendszer módszerét követve elkészítettek egy 43 stressz indukált transzkripciós faktor cDNS-ét tartalmazó „mini” cDNS könyvtárat. *Arabidopsis*ba transzformálás után megnövekedett só-toleranciát mutató növényeket kerestek a T1 generációban. Számos ilyen növényt találtak, az egyik jellemzése során azonosították a *bZIP60* gént, ami feltételezhetően az endoplazmatikus retikulum stressz válaszaiban játszik fontos szerepet. A *bZIP60* gén túltermelése legalább 29 más *Arabidopsis* gén kifejeződésére volt hatással (Fujita és mtsai, 2007).

2.2.6 Fordított genetikai analízis

A mutáns fenotípusok keresésén vagy szelekcióján alapuló genetikai módszerekkel szemben a fordított genetikában a mutációk azonosítása vagy létrehozása a cél. Az eljárás lényege az, hogy bizonyos gének működésének megváltozását követően következtetni lehet azok funkciójára. Általában T-DNS vagy transzpozon mutagenézissel nagyszámú mutánst állítanak elő, ezt követően egy adott gén mutációja azonosítható egy

PCR alapú szűréssel a mutáns populáció *pool*-okban (Krysan és mtsai, 1999; Parinov és mtsai, 1999). A fordított genetika fontos módszere a funkcionális genomikai kutatásoknak, melyek célja nagyobb mennyiségű gén funkciójának jellemzése (Parinov és mtsai, 1999; Sessions és mtsai, 2002; Sussman és mtsai, 2000).

2.3 AZ ARABIDOPSIS ALKOHOL DEHIDROGENÁZ 1 GÉN TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA

Az alkohol dehidrogenáz enzim egy oxido-reduktáz, a sejt oxigén hiányos állapotában a piruvátból képződött acetaldehidet redukálja etanollá. Sachs és munkatársai a fiatal kukorica növények gyökerében az anaerob körülményekre felhalmozódó mRNS-eket vizsgálták és megállapították, hogy a kukorica két alkohol dehidrogenáz génjének (*ADH1*, *ADH2*) transzkriptjei fordulnak elő a legnagyobb számban (Sachs és mtsai, 1980). Az Arabidopsis egyetlen alkohol dehidrogenáz gént (*ADH1*) tartalmaz, aktivitásának növekedését több stressz tényező is kiváltja. Az alacsony oxigén koncentráció (hipoxia), dehidratáció és alacsony hőmérséklet is az *ADH1* promóter által vezérelt GUS enzim működés növekedését idézte elő (Dolferus és mtsai, 1994). Később az is kiderült, hogy az *ADH1* gén ABS kezelés hatására is aktiválódik (de Bruxelles és mtsai, 1996). A kukorica *ADH1* gén promóterének deléciós analízisével fontos transzkripcionális szabályzó elemeket azonosítottak. Az első ilyen elem az ARE motívum volt, ami felelős az oxigénhiány kiváltotta indukcióért. Az ARE elem két fontos szabályzó szekvencia között helyezkedik el, ezek a GC- és GT-gazdag motívumok, nagyon fontosak a hipoxiára adott válaszok szabályzásában (Olive és mtsai, 1991; Walker és mtsai, 1987). Az Arabidopsis *ADH1* promóter nem tartalmazza az ARE szekvenciát, viszont megtalálták a GC és GT motívumokat (Olive, 1991). Egy újabb fontos szekvencia elemet a kukorica és az Arabidopsis *ADH1* promóterek szekvencia homológia vizsgálatával fedeztek fel, ez a G-Box volt (CCACGTGG). Az Arabidopsis *ADH1* promóter a kukoricával szemben két G-Box elemet is tartalmaz (G-Box1 és G-Box2)(Ferl, 1989)(2. ábra). Azonosítottak egy, a G-Box-okhoz specifikus kötő transzkripciós faktort, a bZIP családba tartozó GBF1-et, és kiderült, hogy a G-Box elemek szükségesek az *ADH1* ABS általi indukciójáért (de Bruxelles és mtsai, 1996; McKendree és mtsai, 1990). Később találtak egy másik G-Box kötő transzkripciós

faktort, a bHLH-bZIP családba tartozó MYC2 fehérjét, aminek túlermelése az ADH1 mRNS felhalmozódását okozta (Abe és mtsai, 2003). Kang és munkatársai a bZIP típusú ABF3 és ABF4 transzkripciós faktorokat túlermelve idézték elő az ADH1 transzkriptek megnövekedett szintjét, s a stressz körülményeket biztosítva (Kang és mtsai, 2002). Egy közlemény beszámolt arról, hogy a GT motívumhoz (TGGTTT) egy MYB típusú transzkripciós faktor a MYB2 köt, és ez felelős az *ADH1* alacsony oxigén szint általi indukcióért. Ugyanakkor a MYB2 a G-Box helyekhez kötő transzkripciós faktorokkal együttműködve szerepet játszik az *ADH1* ABS közvetítette aktivációjában is (Hoeren és mtsai, 1998). Dolferus és munkatársai az Arabidopsis *ADH1* promóter elemek stressz válaszokban betöltött szerepét vizsgálták. Az *ADH1* promóter kb. 1 kb szakaszát klónozták és létrehozták olyan változatait, melyek a promóter csak bizonyos fragmentjeit tartalmazták, illetve a teljes hosszúságú promóter ismert szabályzó elemeiben mutációt hordoztak. A deléciókat és mutációkat hordozó *ADH1* promóter szekvenciákat GUS riportergénnel kapcsolták össze. A hisztokémiai festésen alapuló analízis kimutatta, hogy az anoxia, a dehidratáció és a hideg általi *ADH1* promóter aktiválásában egyaránt a -172-től -141-ig tartó rész a legfontosabb, ahol az GT illetve GC motívumok találhatóak. A promóter G-Box1 mutációjának nem volt hatása a hipoxia általi riportergén aktivitásra, de jelentősen csökkent aktivitást találtak a hideg kezelés és mérsékelten csökkent aktivitást a dehidratáció hatására. A G-Box2 promóter elem mutációja sem idézett elő változást a hipoxiára adott válaszban, ugyanakkor a hideg és a dehidratáció is csak nagyon kismértékű riportergén aktivitás csökkenést okozott (Dolferus és mtsai, 1994).



2. ábra. Az Arabidopsis ADH1 promóter funkcionális motívumai.

A Dolferus és munkatársai által klónozott ADH1 promóter, az azonosított szabályzó elemekkel.

3 CÉLKITŰZÉSEK

A munkám célja egy genetikai stratégia kidolgozása volt, mely sikeresen alkalmazható ismert stressz válasz gének transzkripcionális szabályozásának tanulmányozására. A rendszer két komponensből áll. Az egyik a stressz válasz gén promóter és a mögé kapcsolt riportergén, a másik egy szabályozott működésű random cDNS könyvtár.

1. transzformáció kompetens Arabidopsis cDNS könyvtár megalkotása;
2. az ADH1 promóter klónozása és szentjánosbogár luciferáz génhez kapcsolása (*ADHI-LUC*);
3. az *ADHI-LUC* riporter konstrukció Arabidopsis növényekbe juttatása és kifejeztetése;
4. az *ADHI-LUC* transzgént tartalmazó Arabidopsis növények újra transzformálása a cDNS könyvtárral;
5. olyan cDNS-ek azonosítása, melyek túltermelése az *ADHI-LUC* riportergén aktivitásának megváltozását idézi elő;
6. legalább egy, az ADH1 gén aktivációjáért felelős faktor jellemzése.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 FELHASZNÁLT BAKTÉRIUM TÖRZSEK NÖVESZTÉSE ÉS SZELEKCIÓJA

A plazmid DNS-ek *Escherichia coli* sejtekbe való transzformációjához elektrokompetens DH5 α (Invitrogen) törzset használtunk. Az Arabidopsis random cDNS könyvtár készítés különböző lépéseinél az elektrokompetens DH10B (Invitrogen) sejtek transzformációját alkalmaztuk. Az *E.coli* sejtek növesztését 37°C-on, Luria-Bertani (LB) táptalajon végeztük (Sambrook, 1989). Az *E. coli* sejtek szelekciójához a rezisztencia génnek megfelelő antibiotikummal egészítettük ki a táptalajokat a következő koncentrációkban:

karbenicillin 100 μ g/ml

kanamicin 25 μ g/ml

spektinomycin 50 μ g/ml

tetraciklin 25 μ g/ml

Az Arabidopsis genetikai transzformációjához a GV3101 (pMP90) *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtuk (Koncz, 1986; Walkerpeach, 1994). Az Agrobaktérium vonalak növesztése 28°C-on YEB táptalajon történt (Walkerpeach, 1994). Az Agrobaktérium szelekcióhoz felhasznált antibiotikumok végkoncentrációja a táptalajban:

gentamicin 25 μ g/ml

rifampicin 50 μ g/ml

spectinomycin 100 μ g/ml.

4.2 FELHASZNÁLT NÖVÉNYI VONALAK ÉS NEVELÉSÜK

Kísérleteinkhez *Arabidopsis thaliana* (L.) Columbia-0 (Col-0) ökotípusú növényt használtunk. Az Arabidopsis nevelését üvegházi körülmények között és *in vitro* növénynevelő szobában végeztük. Az üvegházban a növények a csírázást követő 4 hétben rövid nappalos körülmények között nőttek (8 óra fény/16 óra sötét). Ahhoz, hogy reprodukív fázisba lépjenek, hosszú nappalos megvilágításba lettek áthelyezve (16 óra

fény/8 óra sötét). Az *Arabidopsis in vitro* nevelését ½MSAR táptalajon végeztük (Koncz, 1994). A növények növekedéséhez növénynevelő szobában rövid nappalos körülményeket biztosítottunk. Az *Arabidopsis in vitro* szelekciójához felhasznált antibiotikumok és alkalmazott koncentrációjuk:

cefotaxim 100µg/ml
higromicin B 20µg/ml
vagy
kanamicin 25µg/ml.

4.3 ARABIDOPSIS SEJTSZUSZPENZIÓ KULTÚRÁK NÖVESZTÉSE

Az *Arabidopsis* levél eredetű „zöld” és gyökér eredetű „fehér” sejtszuszenzió kultúrákat Mathur és Koncz által leírt módon növesztettük (Mathur, 1998), növénynevelő szobában, rövid nappalos megvilágítással illetve sötétben. A táptalajhoz levél eredetű sejtszuszenzió kultúra növesztésénél 0,5µg/ml α-naftalénecetsavat (NAA) és 0,1µg/ml kinetint, a gyökér eredetű sejtszuszenzió kultúrához 1µg/ml 2,4-diklorofenoxiecetsavat (2,4-D) és 0,2µg/ml kinetin hormonokat adtunk.

4.4 ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.4.1 Plazmidok tisztítása és genetikai módosítása

Plazmid DNS tisztítását *E. coli* baktérium tenyészetekből illetve a DNS minták agarózgélén történő méret szerinti elválasztását Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módon végeztük. A plazmid DNS lánc hasítása, a láncvégek defoszforilálása és ligálása a Fermentas cég által gyártott restrikciós endonukleázokkal, alkáli foszfátázzal (CIAP) illetve T4 DNS ligázzal történt a gyártó által javasolt reakciókörülmények között. A DNS minták agarózgélből történő kivonása QIAquick gél extrakciós kittel (QIAGEN) történt a termék protokollban leírtak szerint.

4.4.2 Növényi molekuláris biológiai módszerek

A növény genomi DNS tisztítását az ún. Dellaporta DNS miniprep módszerrel végeztük (Weigel, 2002). A növényi minták össz-RNS kivonása az egy lépéses Trizol reagens módszerrel készült (Chomczynski, 1987). A növényi minták mRNS szintű génkifejeződés vizsgálataihoz két módszer alkalmaztunk; a szemi-quantitatív RT-PCR-t és a valós-idejű RT-PCR-t (Q-PCR). Mindkét esetben a növényi mintákból kivont RNS-t DNáz kezeltük a Fermentas cég DNáz enzimével, a reakciókörülmények beállításához a gyártó ajánlásait követtük. A DNáz kezelt RNS-ből 1 µg-ot használtunk a reverz transzkripcióhoz, amit az Applied Biosystems *High capacity cDNA reverse transcription kit*-jével végeztünk 20 µl reakció térfogatban a gyártó protokollját követve. A PCR reakciók során alkalmazott primerek listája megtalálható a Függelék F1. táblázatában.

A szemi-quantitatív RT-PCR reakciót 50 µl térfogatban végeztük Fermentas *Recombinant Taq* polimerázzal templátként 1 µl cDNS-t használva (a reverz transzkripció reakciótermékének 20-ad része). A következő fűtési programot használtuk: 94°C/2perc, 25-35 x (94°C/30mp, 60°C/30mp, 72°C/30mp), 72°C/7perc.

A valós-idejű RT-PCR reakciókat SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) felhasználásával végeztük ABI PRISM 7700 szekvencia detektáló rendszerrel (Applied Biosystems), ezt a fűtési protokollt követve: 95°C/10 perc, 40-45 x (95°C/10mp 60°C/1perc).

4.4.3 Az Arabidopsis transzformációja

A növények T-DNS transzformációja a nőivarú gametofitakon keresztül történt Agrobaktérium közvetítette géntranszfer módszerrel (Clough, 1998).

4.4.4 Növények antibiotikum szelekciója

A transzformált növények (T1 generáció) antibiotikum szelekciójához és az egyes vonalak szegregációs vizsgálatához a magokat 25 µg/ml kanamicin vagy 20 µg/ml higromicin B antibiotikumokkal kiegészített ½MSAR növényi táptalajon csíráztattuk, a T-DNS által kódolt rezisztencia marker szerint. Az antibiotikummal kiegészített

táptalajon rendszerint minden mag kicsírázott, de csak a T-DNS inszerciót tartalmazó növények voltak képesek további növekedésre, a többi növény néhány nap múlva elhalt. Szelekció során a táptalaj 100µg/ml cefotaximot is tartalmazott, hogy megakadályozzuk a maghépben túlélő Agrobaktérium növekedését. Szegregációs analízisnél az egyes vonalak 50-60 magját csíráztattuk a megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajon, a növekedésre képes és nem képes csíranövények arányát számoltuk. Homozigóta vonalakat az egy inszerciót tartalmazó (3:1 arányban szegregáló) T2-es generáció utódain között azonosítottunk.

4.4.5 Luciferáz enzimaktivitás mérése

A luciferáz enzimaktivitásból eredő biolumineszcencia mérését 12-14 napos *in vitro* növesztett növényeken végeztük. A növényeket 2mM d-luciferin (Biosynth AG) oldattal permeteztük és Visilux Imager CCD kamera rendszerrel (Visitron Systems) fényképeztük 10 perc exponálással, 5 perc sötét adaptációt követően. A fényképeket Metaview 4.5r6 (Universal Imaging Corporation) szoftverrel elemeztük. Az eredményeket Microsoft Excell 2004 (Microsoft Corporation) értékeltük ki. Képsorozat méréseknél a szoftver automatikusan készített képeket 30 perces időközökkel 16-24 órán keresztül.

Az *ADHI-LUC* transz-aktiválás genetikai szűrésében a transzformált növények magjait *in vitro* 20µg/ml higromicin tartalmú ½MSAR táptalajon csíráztattuk, a 7 napos életképes csíranövényeket áttettük egy antibiotikumot nem tartalmazó ½MSAR táptalajra, és függőleges pozícióban további 5-7 napig növesztettük. A CCD képalkotással először egy kontroll mérést végeztünk és meghatároztunk egy alap biolumineszcencia értéket, majd a növényeket ösztadiol oldattal permeteztük, 6 és 24 óra elteltével a mérést megismételtük.

4.4.6 β-glükuronidáz (GUS) aktivitáson alapuló hisztokémiai enzimfestés

A GUS enzim aktivitáson alapuló hisztokémiai festéshez Kirsten Bomblies módszerét alkalmaztuk (Weigel, 2002). Szubsztrátként 2mM X-GlcA-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-glükuronik sav, Duchefa) használtunk.

4.4.7 ADH enzim festés

Az alkohol dehidrogenáz enzim működés vizsgálata nitro-kék tetrazolium hisztokémiai festéssel történt (Baud és Graham, 2006). A módszer azon az elven működik, hogy az ADH enzim működése során keletkező NADH a szintelen nitro-kék tetrazoliumot kék színű formazánná redukálja. Három hetes *in vitro* növesztett csíranövényeket kezeltünk 4 μ M ösztadiol és 0,1% DMSO vagy 0,1% DMSO mint kontroll tartalmú folyékony 1/2MSAR táptalajon 24 órán keresztül. Ezt követően a csíranövényeket 100mM nátrium-foszfát (pH 7.5) , 400 μ M NAD⁺, 100 μ M Nitro Blue Tetrazolium (Sigma-Aldrich) és 3% etil-alkohol szubsztrátot tartalmazó ADH1 reakciópufferben inkubáltuk 30°C-on, 10 percen keresztül. A növényeket ezután desztillált vízbe raktuk.

4.5 AZ INDUKÁLHATÓ ARABIDOPSIS CDNS KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE

4.5.1 cDNS szintézise

Lefagyasztott Arabidopsis mintákból össz-RNS-t tisztítottunk, ez szolgált templátként a SMART PCR technológián alapuló alapuló cDNS szintéziséhez (Zhu, 2001). Az első-szál cDNS szintézisét és az azt követő cDNS amplifikációt *Super Smart PCR Synthesis Kit*-tel (Clontech) végeztük. A többlépéses reakció során felhasznált primerek listája a Függelék F1. táblázatában található. Az első-szál cDNS reakció komponensei:

4 μ l RNS (1 μ g/ μ l)
 1 μ l 3' CDS primer II A random oligo
 1 μ l Smart II A primer
 1 μ l dNTP (10mM)
 6 μ l H₂O

Ezt 65°C-on inkubáltuk 2 percen keresztül, majd 42°C-ra helyeztük és hozzámértünk:

4 μ l 5Xpuffert
 2 μ l DTT-t (100mM)
 1 μ l Superscript reverz transzkriptázt (Invitrogen).

További 1 órán keresztül 42°C-on inkubáltuk. A terméket templátként használtuk az 5' PCR primer II A-val és *Advantage 2* polimeráz mixszel (Clontech) történő 18 ciklusos cDNS szintézishez. A PCR reakció 100µl térfogatban végeztük:

80µl H₂O
 10µl 10X *Advantage 2* PCR puffer
 2µl dNTP (10mM)
 4µl 5' PCR primer II A (12µM)
 2µl *Advantage 2* polimeráz mix
 2µl első-szál cDNS

A PCR gépen ezt a fűtési programot állítottuk be: 95°C/90mp, 65°C/30mp, 68°C/6perc, 18 x (95°C/10mp, 65°C/10mp, 68°C/6perc), 68°C/10perc, 4°C. A keletkező termékből 10µl-t használtuk az ATTSM1 és ATTSM2 primerekkel történő 5 további ciklushoz. A reakcióhoz Platinum *Pfx* DNS polimerázt (Invitrogen) használtunk. A reakció:

54µl H₂O
 10µl 10X *Pfx* amplifikációs puffer
 10µl 10X PCR_x enhancer oldat
 4µl MgSO₄ (50mM)
 0,5µl ATTSM1 (100µM)
 0,5µl ATTSM2 (100µM)
 10µl dNTP (2,5mM)
 1µl Platinum *Pfx* DNS polimeráz
 10µl cDNS templát

A reakcióhoz kétlépéses fűtési programot használtunk: 94°C/2perc, 5 x (94°C/15mp, 68/375mp), 4°C. A keletkező cDNS-ek 5' és 3' vége is attB szekvencia motívumot kapott, ami a Gateway rekombinációnak teremtette meg a lehetőségét. A klónozások előtt a cDNS-eket *QIAquick PCR purification kit*-tel (Quigen) tisztítottuk a gyártó utasításait követve.

4.5.2 A cDNS szálak vektorba klónozása

Az attB rekombinációs véget tartalmazó cDNS populációt *BP clonase* (Invitrogen) reakcióval pDONR201 (Invitrogen) klónozó vektorba építettük be. A reakciót a gyártó által javasolt módon mértük össze és egy éjszakán át hagytuk működni. A képződő terméket *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, a másnapra felnövő kolóniákból kb. egymilliót gyűjtöttünk és kevertünk össze. Ebből plazmid DNS-t tisztítottunk és azt „entry” klónként *LR clonase* (Invitrogen) általi reakcióra használtuk. Ennek eredményeként a cDNS-eket a pER8-GW expressziós vektorba ugrasztottuk. Ezt a konstrukciót *E. coli* sejtekbe transzformáltuk majd félmillió kolóniából plazmid DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-t elektrokompetens GV3101/pMP90 Agrobaktérium sejtekbe transzformáltuk. A felnövő Agrobaktérium kolóniákból ugyancsak mintegy félmilliót gyűjtöttünk és kevertünk össze, ezt használtuk Col-0 vad típusú növények genetikai transzformációjára.

4.6 AZ ADH1 PROMÓTER - LUCIFERÁZ RIPORTERGÉN KÉSZÍTÉSE

Az Arabidopsis promóter klónozás első lépéseként PCR reakcióval felszoroztuk az Arabidopsis 1. kromoszómáján található *ADH1* gént megelőző mintegy 2,5kb hosszú DNS szakaszt. A reakciót a *proof-reading* aktivitású *Phusion* polimerázzal (Finnzyme) végeztük, a gyártó utasításait követve. A reakcióhoz a pADH-A és pADH-B primereket használtuk. A terméket T4 ligáz reakcióval pBluescript II SK(+) (Stratagene) klónozó vektorba építettük BamHI és HindIII hasítóhelyek közé és a T3, T7, pADH1, pADH2, pADH3 és pADH4 primerekkel történő szekvenálással ellenőriztük a bázissorrend helyességét. A létrejött pBS/pADH1 vektorból 2402 bp hosszú szakaszt kihasítottunk HindIII endonukleáz enzimmal és azt T4 ligáz reakcióval a Nagy Ferenc által készített pBIN-luc+ expressziós vektorba építettük, így az Arabidopsis *ADH1* promóter és a szentjánosbogár gén transzkripció fúzióját hoztuk létre, amit *ADH1-LUC* riportergén konstrukciónak neveztünk el. Kolónia PCR-rel ellenőriztük az orientáltságát a pADH4 és LUC-rev primereket alkalmazva (Függelék F1. táblázat).

4.7 SZOFTVERES ALKALMAZÁSOK

A DNS szekvenciák azonosítását homológia vizsgálat alapján a TAIR BLAST alkalmazásával végeztük (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>). A többszörös szekvencia összerendezéshez (multiple sequence alignment) a ClustalW programot (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), a fehérje domén vizsgálatához a SMART alkalmazást (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) használtuk. A PCR primereket a Primer3 szoftver (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_web.cgi) segítségével terveztük. A nyilvánosan hozzáférhető génkifejeződés adatokat a Genevestigator adatbázisból vettük (<https://www.genevestigator.ethz.ch>).

5 EREDMÉNYEK

5.1 AZ INDUKÁLHATÓ ARABIDOPSIS cDNS KÖNYVTÁR

5.1.1 A transzformáció kompetens cDNS könyvtár előállítás

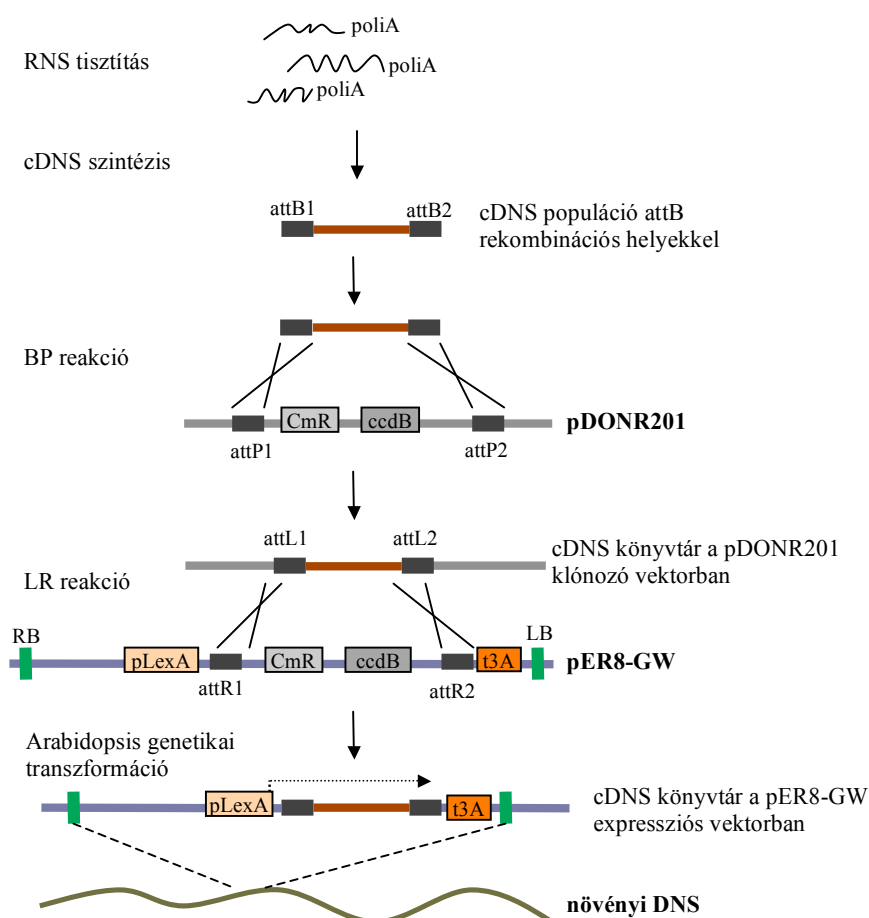
Arabidopsis cDNS könyvtár készítéséhez tízféle RNS forrást használtunk fel, ezzel próbáltuk biztosítani azt, hogy minél többféle szövet és szervspecifikus mRNS legyen reprezentálva. Különböző életkorú Arabidopsis növények szöveteiből, valamint Arabidopsis hajtás (zöld) és gyökér eredetű (fehér) sejtszuszpenzióból vettünk mintát. Felhasználtunk só stressznek kitett csíranövényeket és fehér sejtszuszpenziót is, ennek érdekében a táptalajokat 200mM NaCl-al egészítettük ki. Az 1. táblázat összefoglalja az RNS tisztításához felhasznált minták eredetét. A mintákból származó össz-RNS-t egyenlő arányban kevertük össze a cDNS szintéziséhez.

<i>mintavétel eredete</i>	<i>nevelési körülmények</i>	<i>kezelés</i>
14 napos növények	üvegházban	-
rozetta levelek		
virágzat, zöld becők		
10 napos növények	<i>in vitro</i>	
10 napos etiolált növények		
fehér sejtszuszpenzió		
zöld sejtszuszpenzió		
fehér sejtszuszpenzió		
fehér sejtszuszpenzió		
10 napos csíranövények		200mM NaCl/2 óra
		200mM NaCl/6 óra
		200mM NaCl/6 óra

1. táblázat. Az Arabidopsis RNS tisztításához felhasznált minták eredete

Az üvegházban nevelt 14 napos növényeket gyökérrel együtt a földtől megtisztítva fagyasztottuk le, a néhány hetes növények rozetta leveleit illetve vegetatív fázisban levő növények virágzatát és zöld, éretlen becőit gyűjtöttük be. A növénynevelő szobában a tíznapos csíranövények egyik részét rövid nappalos megvilágítás mellett, másik részét a fény elől elzárva csíráztattuk és növesztettük. Mintákat vettünk sóstressznek kitett növényekből és fehér sejtszuszpenzióból is. Ehhez a növényi táptalajokat 200mM NaCl-al egészítettük ki, és a mintavételezés 2 illetve 6 óra elteltével történt.

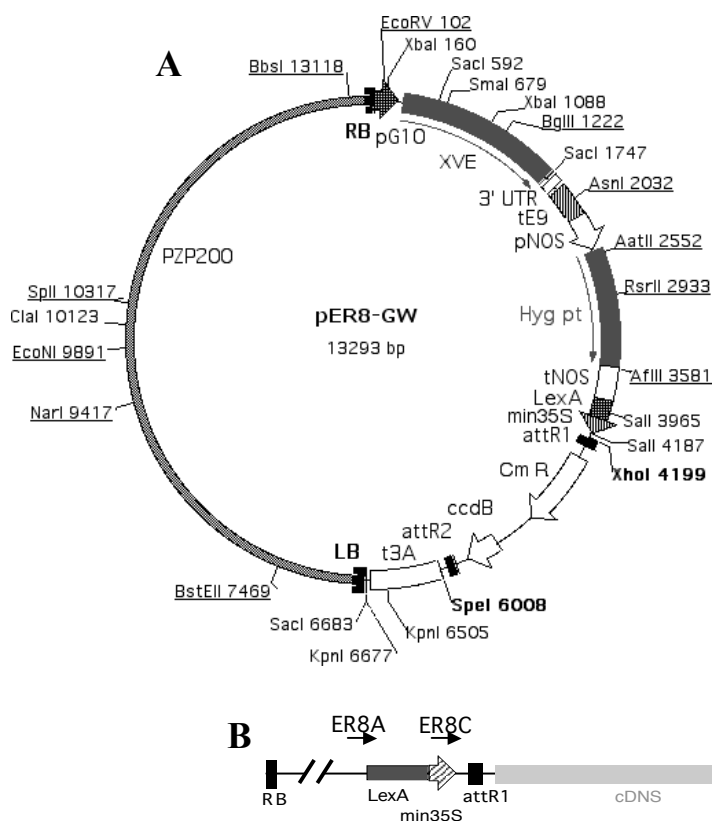
A keletkező cDNS szálakat alkalmassá tettük a Gateway rekombináción alapuló klónozó stratégia használatára. Ehhez - egy PCR reakcióval - a cDNS-ekhez illesztettük a rekombinációt biztosító attB helyeket. Ezt követően a cDNS szálak klonáz enzimek által rekombinációval jutottak a pDONR típusú klónozó plazmidba, majd onnan a pER8-GW növényi expressziós vektorba. (3. ábra). A többlépéses folyamat végén a pER8-GW expressziós vektorba juttatott cDNS könyvtár *Agrobacterium* sejtekbe transzformáltuk így alkalmassá váltak a növények genetikai transzformációjára. A folyamat részletes leírása a 4.5 fejezetben található.



3. ábra. A cDNS könyvtár készítésének lépései

Az *Arabidopsis* RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk, amit egy PCR reakcióval rekombinációra alkalmas attB helyekkel láttunk el. A cDNS populációt először *BP clonase* által pDONR típusú klónozó vektorba klónoztuk, majd *LR clonase* reakcióval pER8-GW növényi expressziós vektorba, ezt *Arabidopsis* génállományába építettük.

A cDNS könyvtár növényekben történő kifejeztetéséhez használt pER8-GW expressziós vektor egy szteroid típusú állati hormon, a β -ösztadiol receptorát kódoló XVE gént tartalmazza. Az ösztadiolt megkötő XVE fehérje a LexA-min35S promóterhez kötődik és elindítja a mögé épített DNS szakasz expresszióját (4. ábra). Ez a vektor a Nam-Hai Chua és munkatársai által előállított, ösztadiol indukálható pER8 plazmid változata (Zuo és mtsai, 2000), amelybe az XhoI és SpeI hasítóhelyek közé egy Gateway expressziós kazettát építettek Imre Somssich kutatócsoportjában (4/A ábra). Agrobaktérium közvetített genetikai transzformációval a növényi sejtekbe juttatott pER8-GW vektor genomba épülő T-DNS eleme tartalmazza az egyes cDNS inszerteket, amelyek kifejeződése, exogén úton bevitt ösztadiollal indukálható.



4. ábra. A pER8-GW vektor és T-DNS térképe.

A: A pER8-GW vektor térképe. Rövidítések: RB, LB: a növényi genomba integrálódó T-DNS jobb illetve bal oldali határszekvenciái, pG10: az XVE fehérje transzkripcióját szabályozó szintetikus promóter, XVE: XVE transzkripció faktort kódoló szekvencia, tE9: rbcS E9 poli(A) járulékos szekvencia, pNOS: nopaline szintáz promóter, Hyg^r pt: higromicin foszfortranszferáz gén, tNOS: nopaline szintáz poli(A) járulékos szekvencia, LexA: XVE transzkripció faktort kötő hely, attR1, attR2: Gateway rekombinációs helyek, CmR: kloramfenikol rezisztencia gén, ccdB: kontraszelekciót lehetővé tevő gén, t3A: rbcS 3A poli(A) járulékos szekvencia. B: A növénybe épülő T-DNS. Az attR rekombinációs helyek közötti cDNS PCR amplifikálása az ER8A-ER8B primerpárral, megszekvenálása az ER8C belső primerrel történik.

5.1.2 A cDNS könyvtár jellemzése

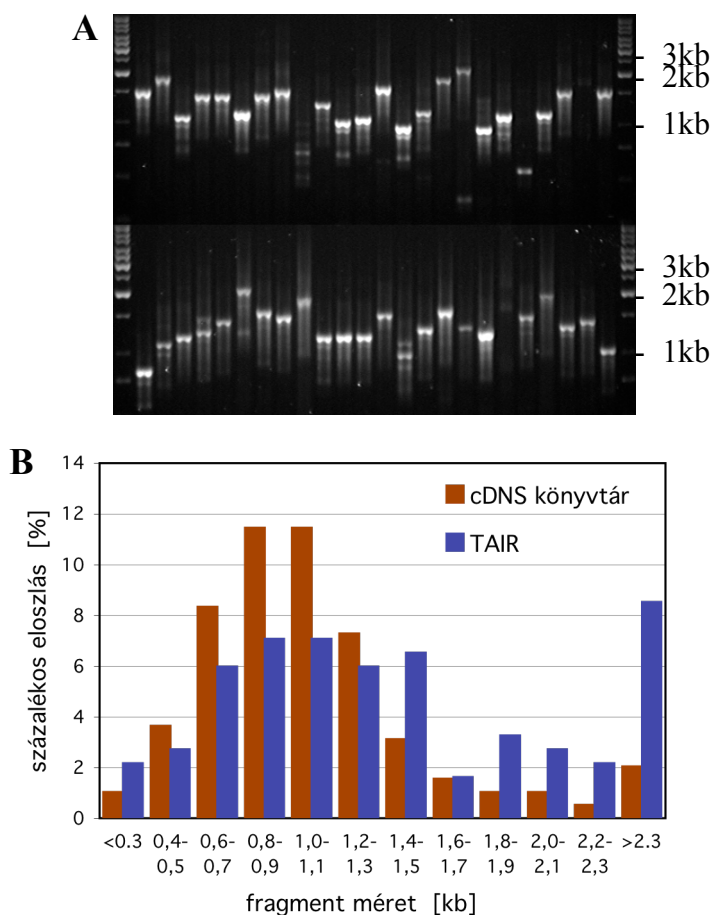
A cDNS könyvtár pER8-GW expressziós vektorba építése után a konstrukciót *E. coli* sejtekbe transzformálással sokszoroztuk (lásd 4.6.2 fejezet), majd random kiválasztottunk 12 kolóniát és a vektorspecifikus ER8A és ER8B primerekkel kolónia PCR-t végeztünk, a PCR terméket az ER8C primerrel megszekvenáltattuk (4/B ábra). A kapott szekvenciákon a TAIR szekvencia adatbázisán alapuló összehasonlító analízis végeztünk. A kapott szekvenciák minden esetben tartalmazták a 3' végi poliA motívumot, tehát 3' végről teljesek, azonban 5 cDNS 5' vége hiányos volt. Az első szekvenálási kísérlet szerint a cDNS könyvtár több mint a fele teljes hosszúságú cDNS (később jóval több cDNS klón megszekvenálása után is hasonló eredményeket kaptunk). A 2. táblázat tartalmazza a szekvencia analízis által azonosított cDNS-eknek megfeleltethető gének akcessziós számát, az általuk kódolt fehérjék ismert vagy feltételezett funkcióját és a cDNS első nukleotidjának távolságát a transzkripció START pontjától.

	gén	fehérje funkció	5' vég távolsága a START-tól (nukleotid)	cDNS állapota
1	At5g08420	ismeretlen, RNS kötés	-141	teljes hosszúságú
2	At5g59310	lipid-transzfer fehérje (LTP4)	-76	teljes hosszúságú
3	At5g26880	tRNA/rRNA metiltranszferáz	-5	teljes hosszúságú
4	At4g15470	ismeretlen	+407	töredék
5	At2g17110	ismeretlen	+2120	töredék
6	At2g02370	ismeretlen, SNARE motívum	-197	teljes hosszúságú
7	At4g02980	auxin kötő fehérje (ABP1)	+387	töredék
8	At2g26590	adhezió szabályozás	-69	teljes hosszúságú
9	At3g02770	dimetilmetakinon metiltranszferáz	-102	teljes hosszúságú
10	At5g46420	16S rRNAs processing (RimM)	+1077	töredék
11	At3g56940	dikarboxilát diiron fehérje(CRD1)	+561	töredék
12	At5g42980	thioredoxin (GIF1)	-104	teljes hosszúságú

2. táblázat. Véletlenszerűen kiválasztott és megszekvenált cDNS-ek.

A táblázat 1. oszlopa az *E. coli* kolónia sorszáma, 2. oszlop az azonosított Arabidopsis cDNS-eknek megfeleltethető gének akcessziós száma, 3. oszlop a gének által kódolt fehérjék leközölt vagy feltételezett funkciója, 4. oszlop a cDNS szekvencia első nukleotidjának távolsága a START kodontól, 5. oszlop a cDNS állapota teljes hosszúságú vagy töredék.

Miután a cDNS könyvtár tartalmazó pER8-GW expressziós vektort Agrobaktérium sejtekbe transzformáltuk, egy újabb vizsgálatban meghatároztuk a cDNS klónok méreteloszlását. Kiválasztottunk 96 felnövő Agrobaktérium telepet és a vektorspecifikus ER8A - ER8B primerekkel kolónia PCR-t futtattunk. A kapott termékeket agaróz gélelektroforézissel méret szerint elválasztottuk. A gélfotó alapján 200 bp-os pontossággal megbecsültük a méretüket és aszerint csoportosítottuk őket. A méret meghatározásnál figyelembe vettük azt, hogy az ER8A-ER8B primerrel végzett PCR reakció terméke 408 bp vektor eredetű szekvenciát is tartalmazott. A fragmentek méreteloszlását összevetettük a TAIR adatbázisából random kiválasztott 96 cDNS méretével (5. ábra). A kiválasztott TAIR cDNS-ek listája megtalálható a Függelékben (F2. táblázat). Az eredményekből arra következtettünk, hogy a cDNS könyvtár fragmentjeinek méreteloszlása hasonlít az Arabidopsis teljes hosszúságú transzkriptek méreteloszlására, ugyanakkor a hosszabb, 2 kb-nál nagyobb cDNS-ekből kevesebbet tartalmaz.



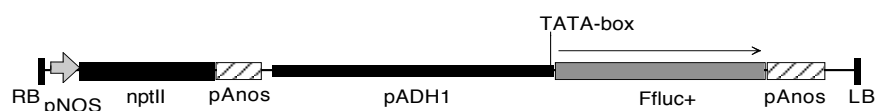
5. ábra: A cDNS könyvtár random cDNS-einek méreteloszlása.

A: 48 PCR fragment agarózgélben történő elválasztása, B: a fragmentek méreteloszlásának összehasonlítása a TAIR Arabidopsis cDNS adatbázisból random módon kiválasztott cDNS-ek méreteloszlásával.

5.2 AZ ADH-LUC ARABIDOPSIS VONAL ELŐÁLLÍTÁSA

5.2.1 Az ADH1-LUC riporter gén konstrukciója

A stresszre indukálódó riporter gén konstrukció létrehozásához megklónoztuk az Arabidopsis *alkohol dehidrogenáz 1* (*ADH1*) 2,4 kb hosszú promóterét, és a promóter nélküli szentjánosbogár luciferáz (*Ffluc+*) gént hordozó pBin-luc+ plazmidba építettük (lásd 4.7 fejezet). Az *ADH1* promóter és a luciferáz gén transzkripció fúzióját hoztuk létre, amit *ADH1-LUC* génkonstrukciónak neveztünk el (6. ábra).



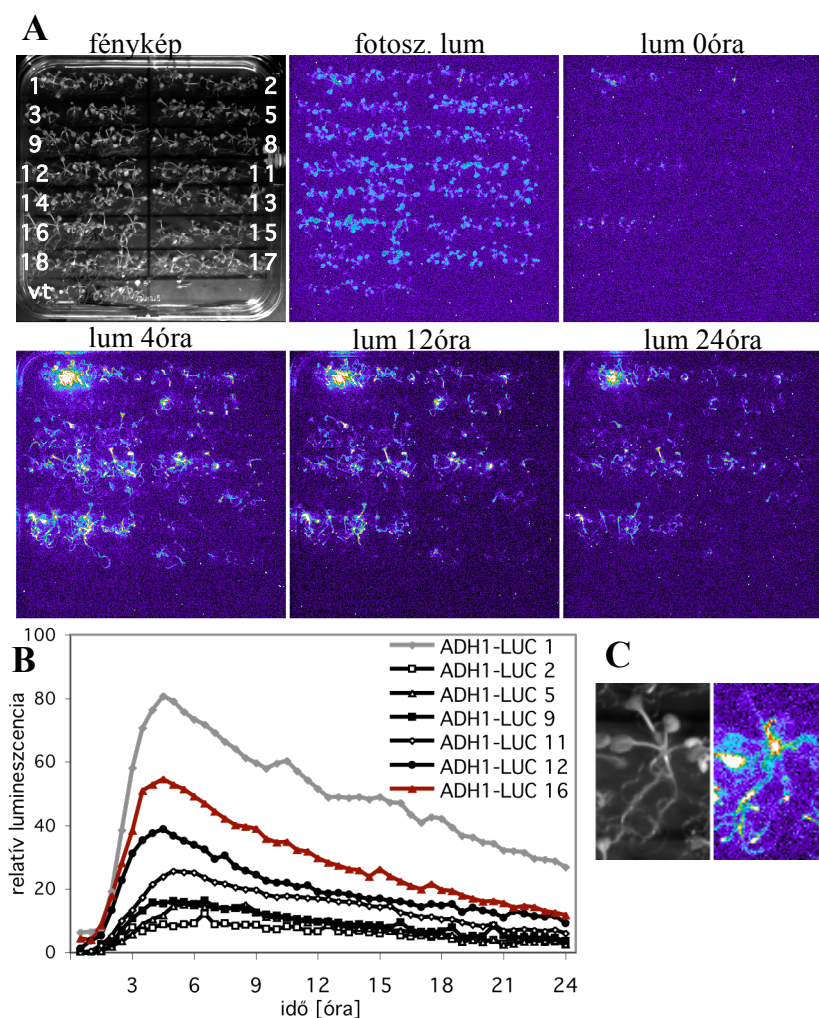
6. ábra. Az *ADH1-LUC* riporter gént hordozó T-DNS térképe.

Rövidítések: RB, LB: a T-DNS határszekvenciái, pNOS: nopalín-szintáz promóter, nptII: kanamicin rezisztenciát biztosító gén, pAnos: poli A szekvencia, pADH1: az *ADH1* gén promóter régiója, Ffluc+: szentjánosbogár luciferáz gén.

5.2.2 Az ADH1-LUC független növényi vonalak tesztelése

Az *ADH1-LUC* riporter gén konstrukciót Agrobaktérium közvetítette géntranszfer módszerével Col-0 vad típusú Arabidopsis növényekbe transzformáltuk. A kanamicin szelekcióval kiválasztott 20 független transzformáns növény, CCD képalkotással megvizsgálva, már stressz mentes körülmények között is, alacsony intenzitású biolumineszcenciát mutatott. Azonban 20 μ M ABS kezelés után 4 órával 16 növényben többszörösére megnövekedett luciferáz aktivitást mértük. A következő generációjuk kanamicin rezisztencia hasadási aránya 14 vonal esetében 3:1 volt, ezek feltételezhetően egyetlen példányban tartalmazták az *ADH1-LUC* transzgént (Függelék F3. táblázat). Ezeket a növényeket 20 μ M ABS oldattal kezeltük és lumineszcencia változásukat 24 órán keresztül automatikus képsorozatok készítésével mértük. Néhány vonal esetében már az ABS kezelés előtt alacsony szintű biolumineszcenciát detektáltunk az érzékeny CCD kamerával. Az ABS kezelést követően számos vonal luciferáz aktivitása növekedni

kezdett, azonban ennek mértéke eltérő volt. Néhány esetben a növekedés csak viszonylag alacsony szintű volt (3-as, 13-as, 14-es, 17-es vonalak), az 1-es, 2-es, 5-ös, 9-es, 11-es, 12-es és 16-os vonalak esetében lényegesen nagyobb lumineszcencia növekedést találtunk. A többi vonalban nem volt mérhető szignifikáns változás. Amíg a növények fotoszintézisből visszamaradó lumineszcenciája a fotoszintetikus szervekben volt kimutatható, az *ADH1-LUC* gén aktivitásából származó biolumineszcencia az egész növényben (a gyökérben és hajtásban egyidejűleg) megnövekedett ABS kezelés hatására (7. ábra).



7. ábra. A független ADH1-LUC vonalak biolumineszcencia változásának analízise 20 μ M ABS kezelést követően.

A: Az ADH1-LUC vonalak és Col-0 (vt) vad típusú növények fényképe (teszt kép), fotoszintézisből visszamaradó lumineszcencia (fotosz. lum) és luciferáz aktivitásból származó lumineszcenciája (lum) az ABS kezelés előtt (0 óra) és után 4, 12, 24 órával.

B: Hét vonal biolumineszcenciájának növekedése grafikonon ábrázolva.

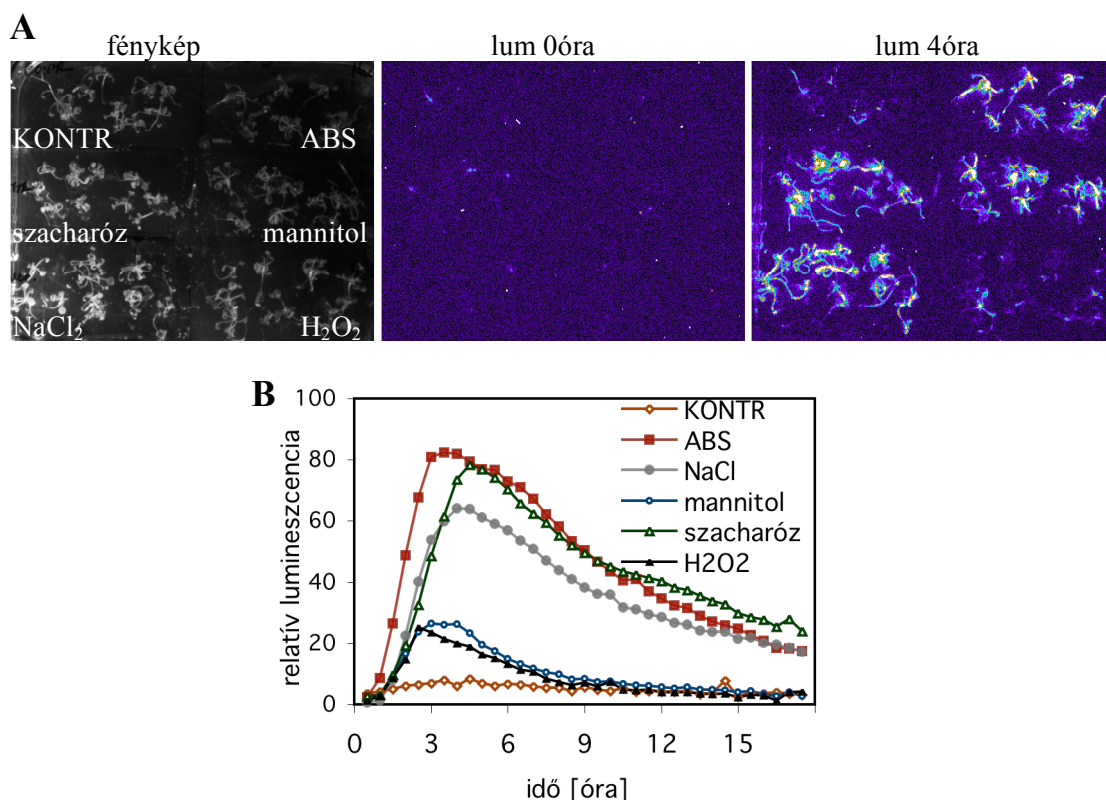
C: A biolumineszcencia a hajtásban és gyökérben egyaránt jelentkezik. A színek összefüggésben állnak a növekvő lumineszcencia intenzitással (kék < piros < sárga < fehér).

Az 1-es, 2-es, 5-ös, 9-es, 11-es, 12-es és 16-os vonalban az ABS hatására detektált biolumineszcencia lassan növekedni kezdett, aminek mértéke kb. másfél óra múlva felgyorsult, a kezelést követő mintegy 4-5 óra elteltével elérte a maximumát, majd folyamatosan csökkenni kezdett. A 7/B ábrán látható grafikon alapján elmondható, hogy luciferáz aktivitás változásának időbeni jellege hasonló, azonban mértéke különböző. Habár a 1-es számú vonal relatív biolumineszcenciája érte el a legmagasabb értékeket, az indukciót követően az 1-es és a 16-os vonalban is kb. 100-szoros növekedést mértünk. A 16-os vonal alapaktivitása jóval kisebb volt, ezért választottuk ki a további kísérleteinkhez.

5.2.3 Az ADH-LUC vonal luciferáz aktivitása stresszre indukálódik

Az ADH1-LUC 16-os vonalból homozigóta vonalat állítottunk elő, amit ADH-LUC-nak neveztünk el. További mérésekkel kimutattuk, hogy az ADH-LUC növények luciferáz aktivitása stressz körülmények hatására is indukálódik. A 200mM NaCl, a 300mM mannitol, a 400mM szacharóz, és a 10 μ M hidrogén-peroxid kezelés is kiváltotta a detektálható biolumineszcencia növekedését (8/A ábra).

A stressz körülmények által kiváltott biolumineszcencia növekedés kb. félóra késéssel jelentkezett az ABS hatásához viszonyítva. A 200mM NaCl és 400mM szacharóz 80-100-szoros intenzitás növekedést okozott, ez kb. megegyezik azzal, amit az ABS kezelés idézett elő, de a maximális értékek mintegy 1 órával később voltak mérhetők. A mannitol és a hidrogén-peroxid hatására létrejött biolumineszcencia változás viszont kisebb volt (18-20-szoros), a maximális értéküket 3-4 óra alatt érték el. (8/B ábra).



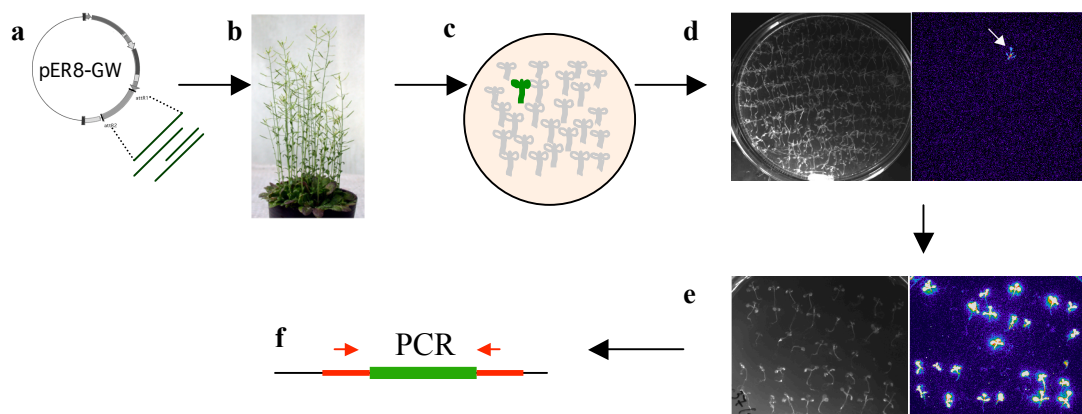
8. ábra. Az ADH-LUC vonal luciferáz aktivitásának változása stressz hatására.

A: Kéthetes ADH-LUC növények lumineszcenciája közvetlenül (0 óra) és 4 órával azután, hogy 20 μ M ABS, 400mM szacharóz, 300mM mannitol, 200mM NaCl, vagy 10mM H₂O₂ tartalmú táptalajra tettük őket. B: a lumineszcencia változások grafikusán ábrázolva az idő függvényében.

5.3 AZ ADH1-LUC RIPOSTERGÉN TRANSZ-AKTIVÁCIÓ VIZSGÁLATA

5.3.1 Megnövekedett *ADH1-LUC* aktivitást mutató vonalak azonosítása

Az ADH1 gén aktivációjáért felelős gének azonosítása céljából, az ADH-LUC vonalat transzformáltuk az indukálható pER8-GW/cDNS könyvtárral és olyan cDNS-eket próbáltunk azonosítani melyek az *ADH1-LUC* riportergén indukcióját okozhatják. A pER8-GW T-DNS-t tartalmazó csiranövényeket higromicin szelekcióval választottuk ki és luciferáz aktivitásukat mértük a cDNS túltermelését előidéző ösztadiol kezelés előtt és után, a mért értékeket összehasonlítottuk. Kiválasztottuk azokat, melyek biolumineszcenciája megváltozott illetve magasabb volt, mint a többi növényé. A kiválasztott vonalakat üvegházba ültettük és a következő generációban vizsgáltuk a T-DNS inszerció szegregálását illetve a biolumineszcenciát (9. ábra, 4.5.6 fejezet).



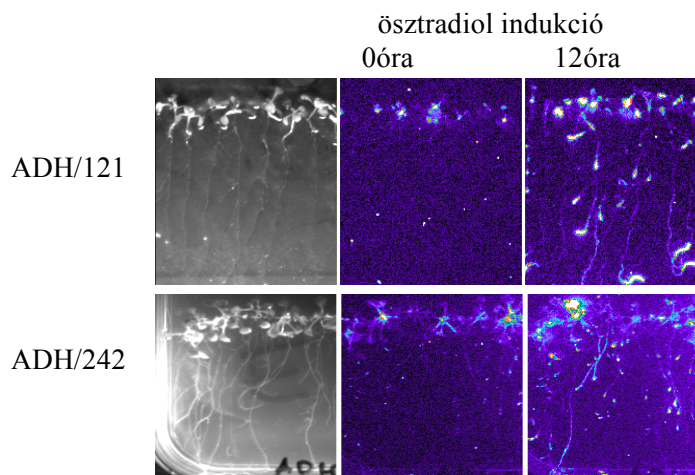
9. ábra. A riportergén aktiváción alapuló genetikai szűrés sémája.

a, A transzformáció kompetens cDNS könyvtár előállítása; b, az ADH-LUC növények genetikai transzformációja; c, T1 generáció antibiotikum szelekciója; d, a transzformánsok lumineszcencia mérése; e, a kiválasztott növények következő generációjának vizsgálata; f, az inszertálódott cDNS azonosítása, PCR-rel és szekvenálással.

Mintegy 20 000 transzformáns csíranövényt átvizsgálása után 11 vonalat azonosítottunk megnövekedett luciferáz aktivitással. Az antibiotikum szegregációs vizsgálatok alapján a vonalak közül 9 egyetlen, 2 valószínűleg két pER8-GW T-DNS inszertet tartalmazott (Függelék F4. táblázat).

5.3.2 Két vonal azonosítása ösztadiol függő luciferáz aktivitással

A kiválasztott 11 vonal luciferáz aktivitását vizsgáltuk 4 μ M ösztadiol kezelés előtt és után. A vonalak többségének megnövekedett biolumineszcenciája nem függött az ösztadiol indukciótól, azonban két vonal esetében - ezek az ADH/121 és az ADH/242-es vonalak - a biolumineszcencia ösztadiol kezelést követő néhány óra múlva növekedni kezdett (10. ábra). A korábban elvégzett higromicin szelekció vizsgálatok alapján az ADH/121 vonal egy, az ADH/242-es vonal két inszertet tartalmazott (Függelék F4. táblázat).



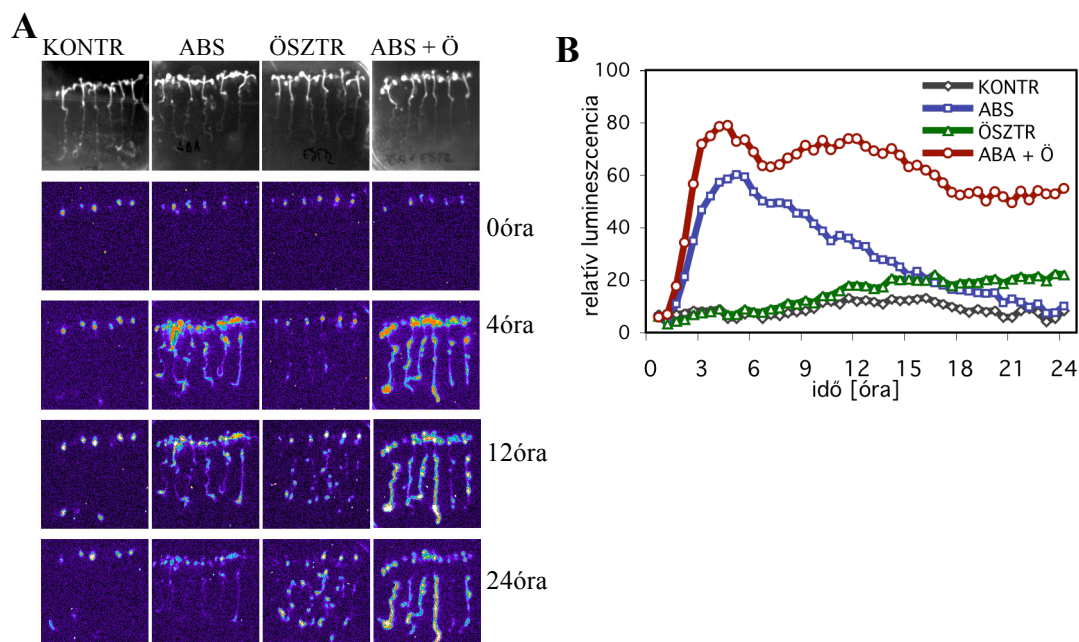
10. ábra. Az ADH/121 és ADH/242 vonal luciferáz aktivitásának ösztadiol indukciója.

Mindkét vonalban már a 4 μ M ösztadiol kezelés előtt luciferáz aktivitás detektálható a hajtás részben, a kezelés után 12 órával megnövekedett luciferáz aktivitás látható az ADH/121 növények gyökerében valamint az ADH/242 növények gyökerében és hajtásában egyaránt.

5.4 AZ ADH/121 VONAL JELLEMZÉSE

5.4.1 Az ADH/121 vonal luciferáz aktivitásának vizsgálata

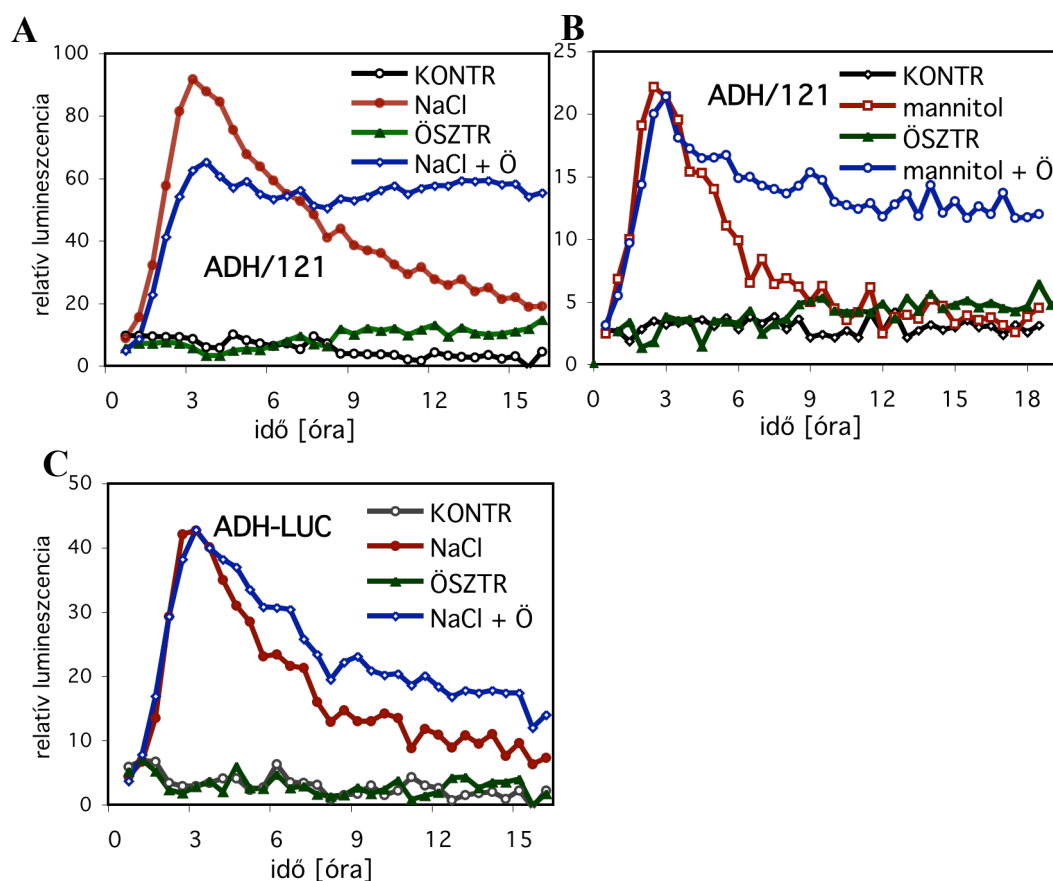
Az *ADH1-LUC* riportergén *transz*-aktivációjának pontosabb vizsgálatához kiválasztottuk ADH/121 vonalat. Korábbi kísérleteinkből kiderült, hogy a stressz körülmények és az ABS kezelés hatására az *ADH1-LUC* gén aktivitása az egész növényben 3-4 órán keresztül növekszik, majd csökkenni kezd (5.2.3. fejezet). Az ADH/121 vonal ABS indukálta luciferáz aktivitása nagyon hasonlított arra, amit az eredeti ADH-LUC növények is mutattak, azonban az ösztadiol kezelés eltérő jellegű riportergén működést váltott ki. Az ösztadiol kezelést követően a hajtásban növekedni kezdett és a gyökérben is megjelent a biolumineszcencia, de a 24 óráig tartó kísérlet ideje alatt, intenzitása nem érte el az ABS által kiváltott értékeket. Amikor a növények egyidejűleg ABS és ösztadiol kezelést is kaptak, a biolumineszcencia az ABS hatására a megszokott módon fokozódott, de - főleg a gyökérben - megemelkedett szinten maradt 24 órán keresztül. (11. ábra).



11. ábra. Az ADH/121 vonal luciferáz aktivitásának változásai ABS és ösztadiol hatására.

A kísérlet leírása: a növényeket négyféle kezelést kaptak, KONTR: 0,1% DMSO oldat, ABS: 20 μ M ABS, ÖSZTR: 4 μ M ösztadiollal, ABS + Ö: kombinált ABS és ösztadiol kezelés. Luciferáz aktivitásukat 24 órán keresztül mértük. A: lumineszcencia változások képe CCD képalkotással a kezeléseket követő 0, 4, 12, 24 óra múltán. B: A lumineszcencia változások grafikonon ábrázolva.

Amikor az ADH/121 növényeket 200mM NaCl vagy 300mM mannitol tartalmú táptalajra helyeztük nagymértékű *ADH1-LUC* aktivitást láttunk a hajtásban és gyökérben egyaránt, ami 3-4 óra elteltével csökkenni kezdett, ahogyan ezt a cDNS inszerciót nem tartalmazó ADH-LUC növényeknél is tapasztaltuk (5.2.3. fejezet). Ösztadiollal kombinálva a NaCl és a mannitol is a riportergén megnövekedett működését idézte elő a kísérletek ideje alatt (12/A ábra). Ugyanakkor az ADH-LUC növények luciferáz aktivitása nem indukálódott ösztadiol hatására valamint a NaCl és ösztadiol kombinált kezelése nem idézték elő a hosszan fennmaradó magas biolumineszcencia értékeket (12/B ábra).



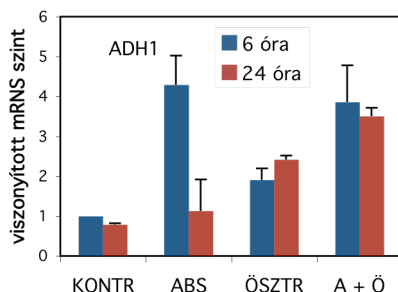
12. ábra. Az ADH/121 és ADH-LUC növények luciferáz aktivitás változása stressz körülmények és ösztradiol hatására.

A: Az ADH/121 növényeket kontroll 1/2MSAR és 200mM NaCl-al kiegészített táptalajra helyeztük, egy részüket 4 μ M ösztradiollal is kezeltük és biolumineszcenciájukat mértük. B: Az ADH/121 növények luciferáz aktivitása kontroll és 300mM mannitollal kiegészített táptalajra helyezést és/vagy 4 μ M ösztadiol kezelést követően. C: Az ADH-LUC növények lumineszcencia változása kontroll és 200mM NaCl tartalmú táptalajra helyezés, valamint 4 μ M ösztadiol kezelés után.

5.4.2 Az ADH1 mRNS szintje megemelkedik ABS és ösztadiol kezelés hatására az ADH/121 vonalban

Az ADH/121 növények endogén ADH1 mRNS szintjét vizsgáltuk valós-idejű RT-PCR-rel. Az ABS kezelést után 6 órával több mint 4-szeres ADH1 mRNS szintet mértünk, 24 órát követően ez a mennyiség lecsökkent és hasonlóvá vált ahhoz, amit a kontroll növényekben mértünk. Az ösztadiol kezelés hatására az ADH1 transzkript szintje a 6. órában 1,8-2-szeresére emelkedett és ehhez képest csak egy kismértékben emelkedett a 24. órában vett mintákban. Az ösztadiol és ABS együtt kb. 4-szeresére növelte az

ADH1 mRNS mennyiségét, ez hasonló ahhoz, amit az ABS indukciónál láttunk, de a transzkript szint nem csökkent számottevően 24 órával a kezelés után (13. ábra). A kapott eredmények megfeleltethetők a korábban mért luciferáz aktivitás változásoknak (5.4.1. fejezet).

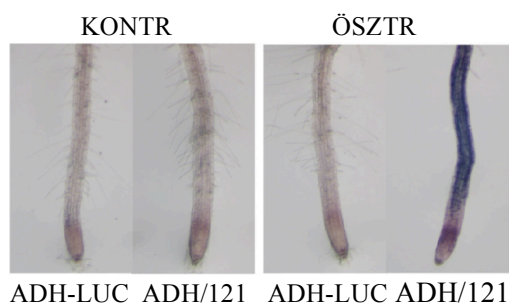


13. ábra. Az ADH1 mRNS szint változása az ADH-121 vonalban ABS és ösztradiol hatására.

A kísérletben kéthetes ADH/121 növényeket kezeltünk 20 μ M ABS-val (ABS), 4 μ M ösztradiollal (ÖSZTR), kombinált kezelésükkel (A + Ö), illetve 0,1% DMSO oldattal (KONTR), 6 és 24 órával később lefagyasztottuk azokat. Az ADH1 mRNS szintjének meghatározását kvantitatív RT-PCR-rel végeztük.

5.4.3 Az ADH1 enzim aktivitása megemelkedik ösztradiol kezelést követően az ADH/121 vonalban

Színreakción alapuló hisztokémiai festést alkalmazva kimutattuk, hogy az ADH1 enzim aktivitása megemelkedett az ADH/121 növények gyökereiben ösztradiol kezelést követő 12. órában. A DMSO kontroll oldattal kezelt kontroll növényekben nem volt kimutatható színreakció. A cDNS-t nem tartalmazó ADH-LUC növények nem festődtek az ösztradiol hatására (14. ábra).



14. ábra. ADH enzim aktivitás hisztokémiai festés.

Az ADH/121 és ADH-LUC növényeket 4 μ M ösztradiollal kezeltük, a kontroll kezeléshez 0,1% DMSO oldatot használtunk. 12 órával később ADH hisztokémiai festést végeztünk leírtak szerint. Az ADH/121 növények gyökerében ösztradiol függő ADH enzim aktivitást mutattunk ki.

5.4.4 Az ADH/121 vonal cDNS inszertjének azonosítása

Az ADH/121 növények genomi DNS-ének izolálását követően vektor specifikus ER8A - ER8B primerpárral végeztünk PCR reakciót. A tisztított PCR terméknek meghatároztuk a nukleotid sorrendjét, a szekvencia megfeleltethető volt az Arabidopsis At1g53910 gén teljes hosszúságú transzkriptjének. E gén terméke a RAP2.12 (Related to Apetala 2) egy AP2/ERF típusú transzkripciós faktor fehérje, amit eddig nem jellemeztek.

A szekvenálással kapott nukleotid szekvencia elemzése során azonosítottuk a cDNS 5' nem transzlálódó régióját, a fehérjét kódoló részt, a 3' nem transzlálódó régiót, a poliA motívumot. A szekvencia a két végén vektor eredetű részletet és a rekombinációért felelős helyeket is tartalmazta (15. ábra). Az adatbázisban leközölt RAP2.12 transzkripttel összehasonlítva a cDNS nukleotid sorrendjében nem tartalmazott eltérést.

```
ACGCTGAAGCTAGTCGACTCTAGCCTCGAGAAAGAGGATCCACCTGAGCATCACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGCCCAACGCAGAGTA
CGCGGGGGAAGAGGCAAGATATAACCCCAAAAGTATCAATTAGTTTCCATTTCGCGCGCTAAGATTCTGTTTTCGAACATTTACACC
CTCAAGAAATCGCCGCCATGTGTGGAGGAGCTATAATATCCGATTTTCATTCCACCGCCGAGGTCTCGCCGTGTTACTAGCGAGTTTATTT
GGCCGGATCTGAAGAAGAATTTGAAAGGATCGAAGAAAGCTCGAAGAATCGTTTCGAATTTCTTCGATTTCGACGCTGAGTTCGAAGCT
GATTTCCAAGGTTTCAAGATGATTCGTCTATCGATTGCGATGATGATTTTCGACGTCGGTGATGTTTTCGCCGATGTGAACCATTCGT
TTTCACTTCGACTCCAAAACCGCCGCTCCGCCGTCGCGAAGGTTTCAGTTTGTGTAAGAAAGTTACTGGCTTGGATGGGGACGCTG
AGAAATCTGCAATAGGAAGAGGAAGATCAGTACCGAGGGATTAGGCAACGTCCTTGGGGAAATGGGCTGCTGAGATACGTGATCCA
AGGGAAGGTGCTAGAATCTGGCTTGAACGTTCAAGACAGCTGAGGAAGCTGCTAGAGCTTACGATGCTGCAGCGCGGAGAATCCGTGG
ATCTAAAGCTAAGGTGAATTTCCCTGAAGAAAACATGAAGGCTAATTCTCAGAAACGCTCTGTGAAGGCTAATCTTCAGAAACAGTGG
CTAAACCTAACCTTAACCAAGTCCAGCTTTGGTTCAGAACTCGAATCTCCTTTGAAAATATGTGTTTCATGGAGGAGAAACACCAA
GTGAGCAACAACAACAACACAGTTTGGGATGACAACTCCGTTGATGCTGGATGTAATGGGTATCAGTATTTTCAGCTCTGACCAGGG
TAGTAATCTTTTCGATTGTTTCGGAGTTTGGTGGAGCGATCAAGCTCCGATAACTCCCGACATCTCTCTCGCGGTATCAACAACAACA
ACTCAGCTCTGTTCTTTGAGGAAGCCAATCCAGCTAAGAAGCTCAAGTCTATGGATTTCGAGACACCTTACAACAACACTGAATGGGAC
GCTTCACTGGATTTCCTCAACGAAGATGCTGTAACGACTCAGGACAATGGTGCAACCCCTATGGACCTATGGAGTATTGATGAAATTC
TTCCATGATTGGAGGAGTCTTCTGAAGAGATCCAGTTTCATGTAAATAAGGCTGCATGTTTGTGAGTTTCCCGCATCGTTCGTTTATCA
ACCTCCAAAACCTTTCTAATGTCTGTTACTTGCATCTTCTCTGCTGTCTCTCTCTCAGGAGTTCCTGTTTGCATTGCGAGA
AGCCATGAGCCTCTATCTTGAGGGTAGTTGTGATGAAGTTAAGTAGAGGCTTATTTTAGGGGTGTGGTAGTTTGTGTTTGTGTAAT
CTTTTGAATTCGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTT
TTTAATCAATAAATCTTCTTTGTATGCTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAGTACTCTGCGTTGACCAGCTTTCTTGTA
CAAAGTGGTGATCCTCCGTTCCATGGGCTAGAAGCTTGTGAGAATTCATCGCCCGGACTGGGTAACTTCCGATCGATTCTAGACTA
GTCGATCCAGGCCTCCAGCTTCGTCCGTATCATCGTTTCGACAACGTCGCAAGTCG
```

15. ábra. Az ADH/121 vonalban azonosított cDNS szekvenciája

Ábramagyarázat: ■ = vektor szekvencia, ■ = Gateway rekombinációs hely, ■ = UTR,
■ = fehérje kódoló szekvencia

5.4.5 A RAP2.12 fehérje az AP2/ERF transzkripciós faktorok B-2 alcsoportjába tartozik

Fehérje szekvencia homológia alapján a RAP2.12 négy transzkripciós faktorról nagy hasonlóságot mutat, köztük a RAP2.2 és RAP2.3/EBP fehérjével (16. ábra). A szakirodalom ezt az öt fehérjét az AP2/ERF transzkripciós faktorok, ERF alcsoportjába sorolja (Sakuma és mtsai, 2002). A B-2 csoport tagjai egyetlen

APETALA 2 típusú DNS kötő domént tartalmaznak. A RAP2.3/EBP gén etilénre indukálódik és bizonyítottan kötődni képes az etilén-válaszért felelős promóter elemhez a GCC motívumhoz (Buttner és Singh, 1997). A RAP2.2 fehérje a karotenoid szintézis szabályozásában játszik fontos szerepet (Welsch és mtsai, 2007).

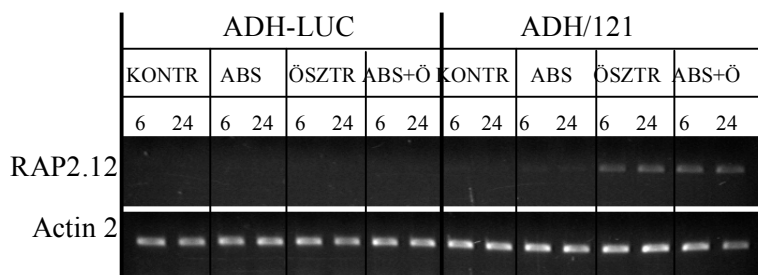
RAP2.12	MCGGAIISDFIPPPSRRTVSEFIWPDLLKKNLKGSKSSKNRSNFFDFD-AEFEADFQGF	59
RAP2.2	MCGGAIISDFIPPPSLRVTNEFIWPDLLKNKVKASKKRSNKRSDFFDLD-DDFEADFQGF	59
RAP2.3/EBP	MCGGAIISDYAP-----LVTAKAGRKLTAEEL--WSELD-ASAADDFWGF	42
At1g72360	MCGGAVISDYIAP-----EKIARSSGKSSWRSGVDFDCSIYDFDGNFDEL	45
At2g47520	MCGGAIISDFIWS-----KSESEPSQLGVS SSR-----	28
	*****:***:	
RAP2.12	KDDSSIDCDDDFDVGDVFAVKPFVFTSTPKPAVSAAA-----EGSVFGKKVTGLDGD	113
RAP2.2	KDDSAFDCEDD---DDVFVNVPFVFTATTKPVASAFVSTGIYLVGSAYAKTVESAQA	116
RAP2.3/EBP	YSTSKLHPTNQ-----VNVK-----EEAVKKEQAT	67
At1g72360	ESDEPF-----VFSSTHKHHASGS	64
At2g47520	-----KKRKPVSVSE	38
	.	
RAP2.12	EKSANRKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRDPREGARIWLGTFKTAEEAARAYDAAARRIRG	173
RAP2.2	EKSSKRKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRDPKGSREWLGTFDTAEAAARAYDAAARRIRG	176
RAP2.3/EBP	EPGKRKRKNVYRGIRKRPWGKWAAEIRDPKGVVWLGTFNTAEAAAMAYDVAACKQIRG	127
At1g72360	ASDGKKKQSSRYKGI RRRPWGRWAAEIRDPKGVVWLGTFNTAEAAARAYDLEAKRIRG	124
At2g47520	ERDGKRERKNLYRGIRQRPWGKWAAEIRDPKGVVWLGTFKTADEAARAYDVAACKIRG	98
	 *:***:***:***** :* * *****:*** ** *	
RAP2.12	SKAKVNFPEE-NMKANSQKR-SVKAN-LQKPVAKPN-----PNPSPALVQNSNISFEN-	223
RAP2.2	TKAKVNFPEEKNPSVVSQKRPSAKTNNLQKSVAKPNKSVTLVQQPHTLSQQYCNNSFPNS	236
RAP2.3/EBP	DKAKLNFDPDLHPPPPNYTP-----PPSSPR-----STDQPPAKKVCVVSQSE-	170
At1g72360	AKAKLNFNNESSGKRKAKAK-----TVQQVEENHEADLDVAVVSSAPSSSCLDFLWE-	176
At2g47520	RKAKLNFNP-----TQVEE-----	112
	::	
RAP2.12	---MCFMEEKHQVSNNNNNQFGMTNSVDAG-CNGYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDQAPI	279
RAP2.2	FGDMSFMEEKPQMYNN---QFGLTNSFDAGGNGYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDHGPK	293
RAP2.3/EBP	-----SELSQPSFP-----VECI GFNGGDEFQNL S-----YGFEPDYDL	204
At1g72360	---ENNPDTLLIDTQWLEDIIMGDANKKHEPNDEEANN-----VDASLL	218
At2g47520	-----EADTKPGGNQNELISE-----NQVESL	134
	:. : :	
RAP2.12	TPDISS--AVINNNNSALFFEEANPAKKLK-----SMDFETPYNNTEWDASLD---FLNE	329
RAP2.2	TPEISS--MLVNNNE-ASFVEETNAAKKLKPNSESDDL MAYLDNALWDTPLEVEAMLGA	350
RAP2.3/EBP	KQQISSLESFLELDG-----NTAEQPSQLD-----	229
At1g72360	SEELLAFENQTEYFS-----QMPFTEGN-----	241
At2g47520	SEDLMALEDYMRFY-----QIPVADD-----	155
	. : : .	
RAP2.12	DAVTTQDNGANPMDLWSIDEIHSMIGGVF	358
RAP2.2	DAGAVTQEEENPVELWSLDEINFMLEGDF	379
RAP2.3/EBP	-----ESVSEVDMWMLDDV IASYE---	248
At1g72360	-----CDSSTSLSSLFDDGGNDMGLWS---	262
At2g47520	-----QSATDIGNLWSYQDSN-----	171
		

16. ábra. Az AP2/ERF2 B-2 alcsalád transzkripció faktorainak szekvencia összerendezése.

A fehérje szekvenciákat a DATF Arabidopsis transzkripció faktor adatbázisból vettük. Az összerendezést a ClustalW alkalmazással készítettük. A bekeretezett rész jelöli az APETALA 2 domént.

5.4.6 A RAP2.12 gén kifejeződése indukálható az ADH/121 vonalban

A korábbiakban azt láttuk, hogy az *ADH1* promóter vezérelt luciferáz aktivitás ABS kezelés hatására az ADH-LUC és az ADH/121 vonalban egyaránt megnövekedett, de ösztadiol hatására csak az ADH/121 vonalban láttunk egy alacsony szintű növekedést. Szemikvantitatív RT-PCR-rel kimutattuk, hogy az ADH/121 növényekben az ösztadiol indukció előidézte a RAP2.12 mRNS mennyiségének megnövekedését, ami kimutatható volt a kezelés után 6 és 24 órával is, ugyanakkor az ABS kezelésre a RAP2.12 nem indukálódott. A cDNS inszerciót nem tartalmazó ADH-LUC növényekben a RAP2.12 mRNS szintje nem emelkedett meg az ösztadiol hatására. (17. ábra).

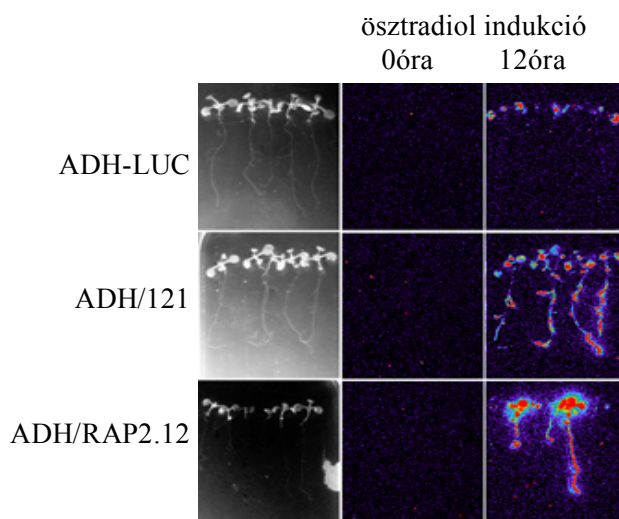


17. ábra. A RAP2.12 mRNS szintje az ABS és ösztadiol kezelések hatására.

Az ADH-LUC és ADH/121 14 napos növények kezelése 20µM ABS-val és/vagy 4µM ösztadiollal történt. A kontroll növényeket 0,1% DMSO oldattal kezeltük. A RAP2.12 specifikus RAP-A -RAP-B primerekkel végzett RT-PCR 30. ciklusában történő mintavétel során kimutatható volt az ösztadiol kezelés hatására megnövekedett RAP2.12 mRNS szint.

5.4.7 A RAP2.12 cDNS klónozása és növénybe transzformálása

Az ADH/121 vonalban azonosított RAP2.12 cDNS-t pDONR201 plazmid közreműködésével pER8-GW vektorba építettük, majd ADH-LUC növényekbe transzformáltuk. A 13 ADH/RAP2.12 transzformáns növényi vonal közül 10 ösztadiol indukálható lumineszcenciát mutatott, aminek jellege nagyon hasonló volt arra, amit az ADH/121 növényeknél láttunk (18. ábra).



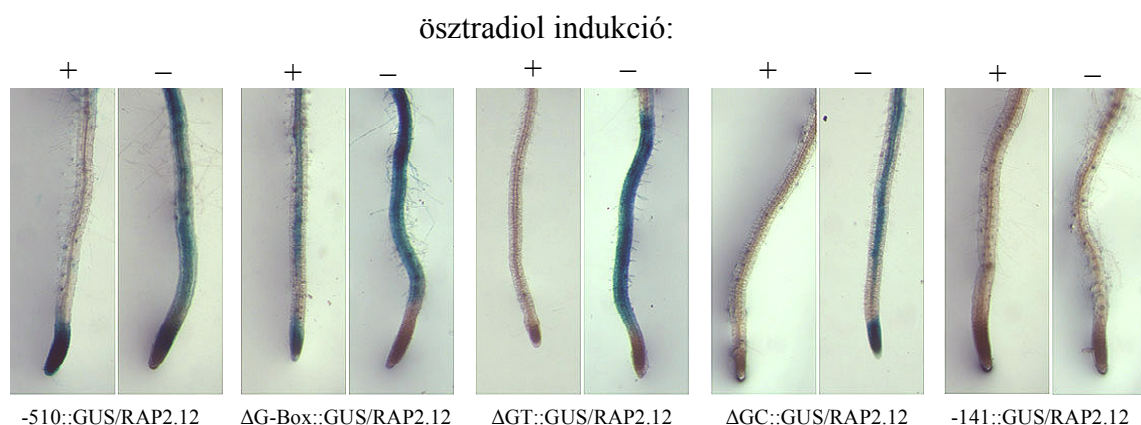
18. ábra. Az ADH/RAP2.12 független transzformánsok luciferáz aktivitása ösztadiol indukció előtt és azt követően.

A 14 napos homozigóta ADH/121, ADH-LUC növények és független ADH/RAP2.12 transzformánsok luciferáz aktivitása a 4 μ M ösztadiol kezelés előtt és 12 órával utána. A felső képen a növények fényképe, az alsón a CCD kamerával rögzített lumineszcenciája látható. Az ADH/RAP2.12 növények hasonló biolumineszcenciát mutatnak, mint az eredeti ADH/121 növények.

5.4.8 A RAP2.12 transzkripciós faktor és ADH1 promóter kölcsönhatásának vizsgálata

Az Arabidopsis *ADH1* gén ABS függő aktivációjáért a promóteren azonosított GT/GC és G-box helyekhez kötő transzkripciós faktorok felelősek (de Bruxelles és mtsai, 1996). A GT-motívumokhoz kötődni képes MYB típusú MYB2 transzkripciós faktor és a G-box elemekhez kötő bZIP és bHLH típusú transzkripciós faktorok fontos szerepet játszanak az *ADH1* gén stressz és ABS általi indukciójában (lásd 2.3 fejezet). Dolferus és munkatársai az Arabidopsis *ADH1* promóter elemek tanulmányozása érdekében, létrehoztak és növényekbe transzformáltak olyan *ADH1* promóter és GUS riportergén fúziókat, melyek a promóter csak bizonyos szakaszait tartalmzták illetve az ismert promóter funkcionális helyeket elrontották (Dolferus és mtsai, 1994). A RAP2.12 cDNS-t hordozó ADH/121 vonalat kereszteztük ezekkel a növényekkel, a T2 generációban vizsgáltuk az ösztadiol indukció hatására bekövetkező GUS festődést a gyökerekben. A mutációt nem tartalmazó 510 bp hosszúságú ADH1 promóter, valamint az elrontott GC, GT és G-Box motívumokat tartalmazó promóterek is képesek voltak a mögójük kapcsolt

GUS riportergén kifejeződésének fokozására, ösztadiol hatására. A rövid, mindössze 141 bp hosszú *ADHI* promóter fragment nem volt elegendő a riportergén ösztadiol függő aktiválásához (19. ábra). Mindezekből arra következtettünk, hogy a RAP2.12 transzkripció faktor az *ADHI* promóter -510 és -141 pozíciója között, de nem az ismert transzkripció faktor kötő helyeken keresztül kerül kölcsönhatásba az *ADHI* gén promóterével.

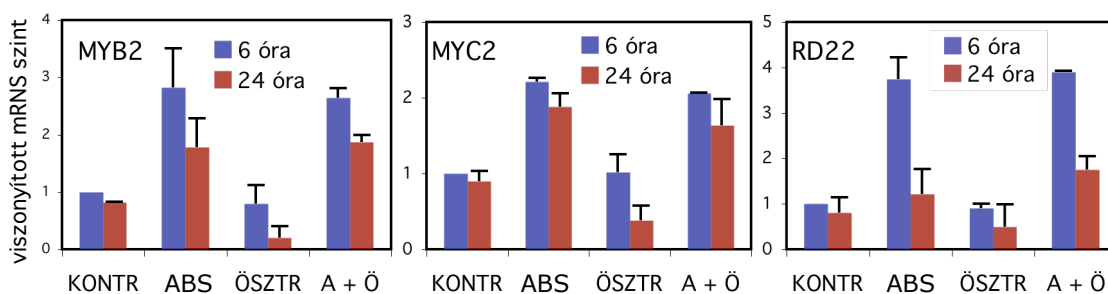


19. ábra. A promóter deléciókat és elrontott promóter elemeket tartalmazó *ADHI*-GUS riportergén gyökérspecifikus aktiválása a RAP2.12 cDNS által.

Az ADH/121 növények és a promóter deléciókat (-510, -141) valamint elrontott promóter elemeket tartalmazó ADH-GUS vonalak keresztezéséből származó növények gyökérspecifikus GUS enzim aktivitását vizsgáltuk. Az ösztadiol indukált növényeket +-al a kontroll oldattal (0,1% DMSO) kezelt növényeket--al jelöltük. A RAP2.12 cDNS az ösztadiol kezeléstől függően indukálta az 510 bp hosszúságú-, valamint az elrontott funkcionális elemeket tartalmazó *ADHI* promóter mögé épített GUS riportergén aktivitását. A 141 bp hosszúságú *ADHI* promóter fragment nem volt elegendő a riportergén aktiválásához.

A MYB2 és MYC2 fehérjék az *RD22* stressz válasz gén transzkripcionális aktivátorai is egyben (Abe és mtsai, 2003). Valós idejű RT-PCR-rel vizsgáltuk, hogy az ADH/121 növényekben az ösztadiollal indukált RAP2.12 cDNS megváltoztatja-e a MYB2 és MYC2 valamint az *RD22* transzkriptek szintjét. Az ABS kezelés után 6 órával a MYB2 és MYC2 transzkripció faktorok mRNS mennyisége 2-3-szorosára növekedett, és 24 óra múltán még mindig fokozott szintjük volt mérhető. Az ösztadiol kezelés nem idézett elő kimutatható változást kifejeződésükben. Az *RD22* gén transzkriptje kb. 4-szeresére emelkedett ABS kezelés után 6 órával, de a 24. órában vett mintákban mennyisége újra lecsökkent. A kombinált ABS és ösztadiol kezelés hatására a mRNS szint változása

nagyjából megegyezett azzal, amit az ABS idézett elő. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy az ösztadiol indukált RAP2.12 cDNS nincs hatással a MYC2, MYB2 és RD22 mRNS szintjére, vagyis a RAP2.12 nem az említett transzkripciós faktorok kifejeződésének indukcióján keresztül aktiválja az *ADH1* gént (20. ábra).

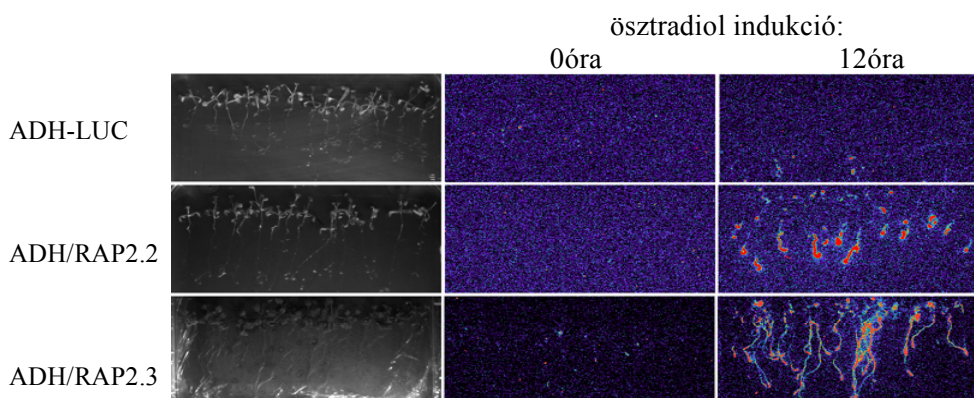


20. ábra. A MYB2, MYC2 és RD22 mRNS mennyiségének változása az ABS és ösztadiol kombinált kezelés hatására az ADH/121 vonalban.

A kísérletben kéthetes ADH/121 növényeket kezeltünk 20 μ M ABS-val és/vagy 4 μ M ösztadiollal, majd 6 és 24 órával később lefagyasztottuk azokat. A mRNS mennyiségének meghatározását kvantitatív RT-PCR-rel végeztük.

5.4.9 Az RAP2.2 és RAP2.3 transzkripciós faktorok is indukálják az *ADH1-LUC* gént

A RAP2.12 fehérjével nagy szekvencia homológiát mutató RAP2.2 és RAP2.3-as gének cDNS-ét elkértük a REGIA Arabidopsis transzkripciós faktor gyűjteményből (Paz-Ares és A Regia, 2002) és beépítettük az ösztadiol indukálható pER8-GW vektorba. A konstrukciókat az ADH-LUC növényekbe transzformáltunk. A T1 generáció tesztelésekor a higromicin tartalmú táptalajon szelektált növények luciferáz aktivitását mértük. Az ösztadiol kezelés hatására mindkét esetben, számos független vonalban mértünk megnövekedett riporter gén aktivitást (21. ábra). Az eredményekből arra következtettünk, hogy a RAP2.12 homológ RAP2.2 és RAP2.3 is képes az ADH1 promóter *transz*-aktivációjára (21. ábra).

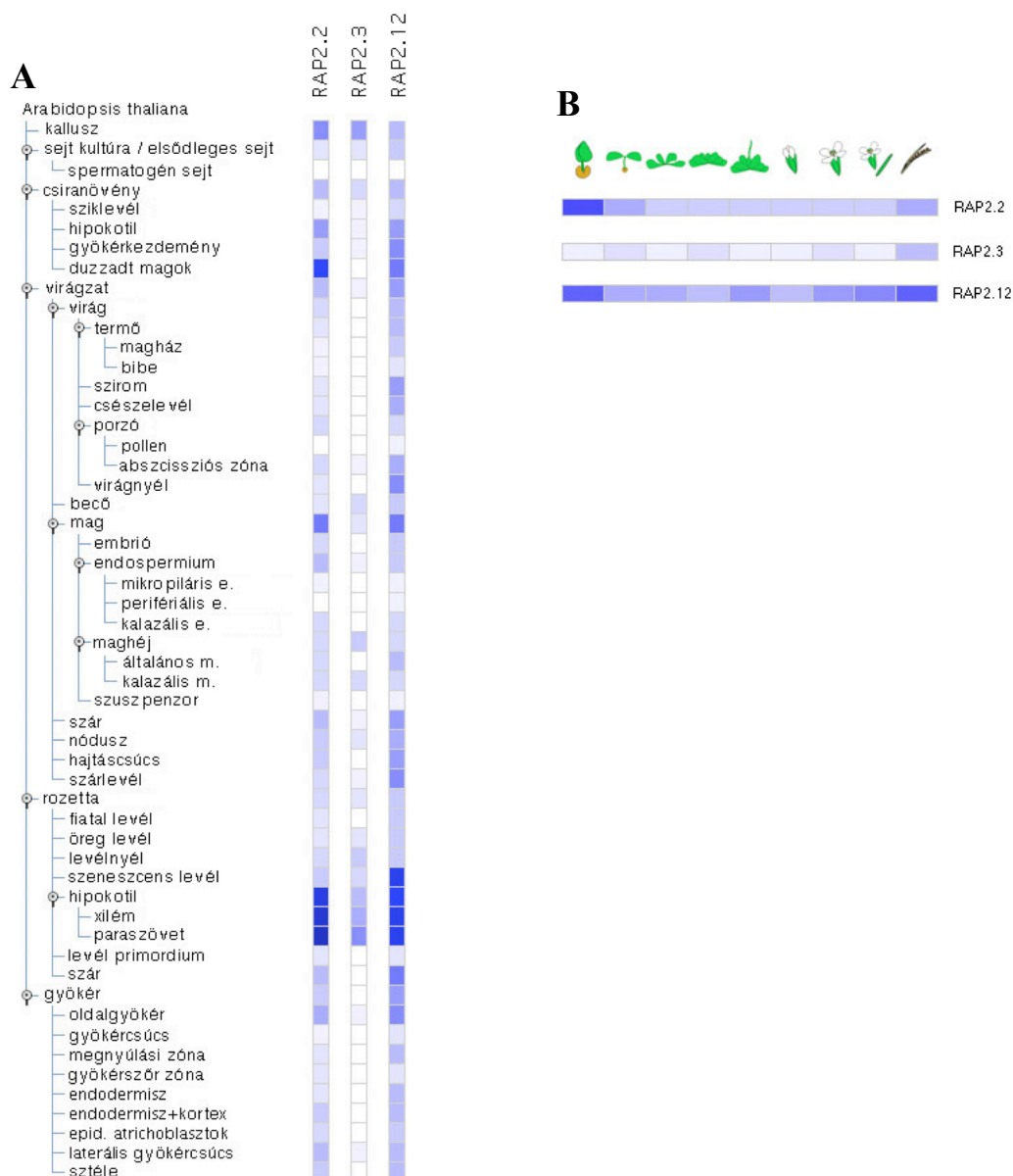


21. ábra. Az ADH/RAP2.2 és ADH/RAP2.3 vonalakban az ösztadiol indukált riporter gén aktiváció. A higromicin rezisztens növények biolumineszcenciája az ösztadiol indukció indukciót követő 12. órában.

5.4.10 A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 gének kifejeződésének szintje a különböző szövetekben illetve fejlődési állapotokban eltérő

A Genevestigator *microarray* adatbázisban közzétett adatok alapján, összehasonlítottuk az *Arabidopsis* különböző szerveiben, szöveteiben és fejlődési állapotában detektált *RAP2.2*, *RAP2.3* és *RAP2.12* gének kifejeződésének mintázatát (Zimmermann és mtsai, 2004). A *RAP2.2* és *RAP2.12* gén általában magasabb szinten fejeződik ki mint a *RAP2.3*, a különböző szövet típusokban és fejlődési állapotokban egyaránt. Az *Arabidopsis* legtöbb szövetében a *RAP2.2* és *RAP2.12* gének transzkriptjeinek mennyisége hasonló, magas az érett magokban, a csírázás korai stádiumában lévő duzzadt magokban, a csíranövények hipokotiljában, valamint a rozetta levelek szárában és vaszkuláris rendszerében. A *RAP2.12* magas gén kifejeződést mutatott a szenescencia alatt álló rozetta levelekben, a szár és a virágzat bizonyos részeiben (22/A ábra).

A *RAP2.2* és *RAP2.12* gének kifejeződése jelentősen megnövekszik az érett és a csírázó magokban, míg a *RAP2.3* gén kifejeződése a különböző fejlődési állapotokban szinte végig alacsony szinten marad, csak az érett magokban mutatható ki némi növekedés (24/B ábra).

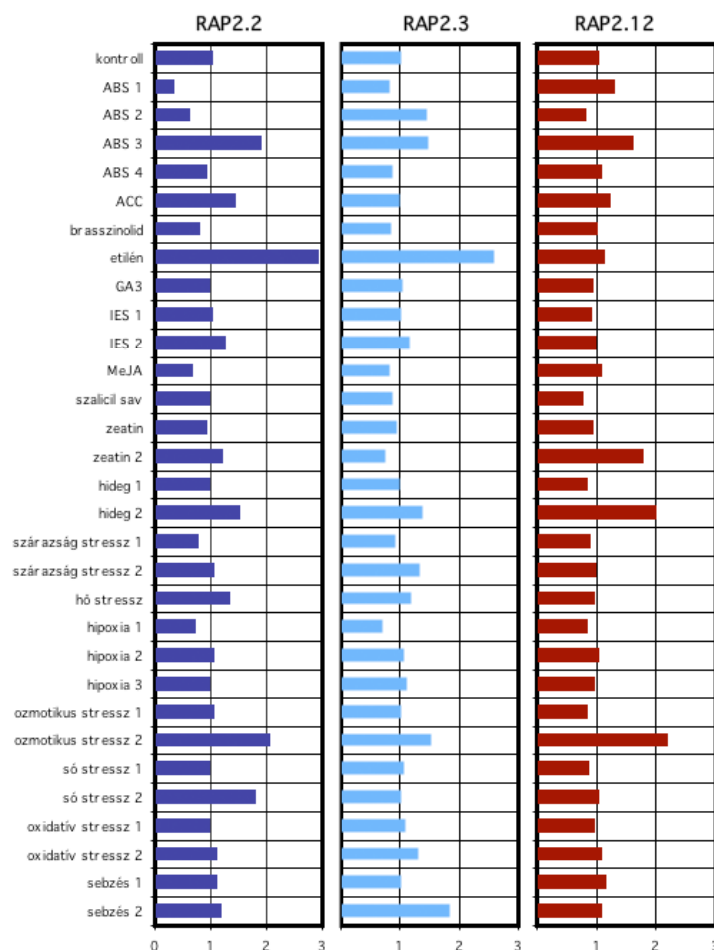


22. ábra. A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 génkifejeződés mintázatának változásai a Genevestigator adatbázis alapján.

A *RAP2.2* és *RAP2.12* gének kifejeződésének mintázata nagyon hasonló a különböző szervekben, szövetekben illetve a növény fejlődési állapotokban. A *RAP2.3* általában jóval alacsonyabb szinten fejeződik ki.

5.4.11 A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 gének kifejeződésének szintje különböző hormon és stressz kezelések hatására

A Genevestigator adatai alapján összehasonlítottuk az *RAP2.2*, *RAP2.3* és *RAP2.12* gének kifejeződésének változásait különböző hormon és stressz kezelések hatására. Az etilén kezelés a *RAP2.2* és *RAP2.3* gének expressziójának a 2,5-3-szoros indukcióját idézi elő, a kezelést követő 3. órában, ugyanakkor a *RAP2.12* gén kifejeződésében nincs jelentős változás. Az ABS hatása nem egyértelmű, bizonyos kísérletekben a RAP gének aktivitása némileg növekedett, másokban csökkent. Mindhárom transzkripciós faktor génkifejeződése növekedett hideg és ozmotikus stressz hatására is. A *RAP2.2* só stresszre, a *RAP2.3* sebzésre, a *RAP2.12* zeatin kezelésre közel kétszeresére indukálódott (23. ábra).



23. ábra. A RAP2.2, RAP2.3 és RAP2.12 génkifejeződés mintázatának változásai a Genevestigator adatbázis alapján, hormon és stressz kezelések hatására.

A különböző kezelések rövid leírása és a mintavétel körülményei a Függelék F5. táblázatában találhatóak.

6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1 RIPIORTERGÉN TRANSZ-AKTIVÁLÁSON ALAPULÓ GENETIKAI RENDSZER KIDOLGOZÁSA

Az Arabidopsis stressz válaszát szabályzó gének azonosítása érdekében egy új genetikai stratégiát dolgoztunk ki. A specifikus stressz jelátvitel közvetítésének tanulmányozása céljából, előállítottuk az *ADHI-LUC* riportergént, amiben a stressz és ABS indukálható Arabidopsis *alkohol dehidrogenáz 1* gén promóterét a szentjánosbogár luciferáz génnel kapcsoltuk össze. Az *ADHI-LUC* riportergén Arabidopsis növényekbe építésével az *ADHI* gén stressz és ABS indukálta működésének illetve transzkripcionális szabályozásának vizsgálatát végezhetjük. Dolferus és munkatársai által létrehozott *ADHI-GUS* riportergén aktivitásának tanulmányozása hisztokémiai festésen alapul, ezért a válaszok időbeni lefutásának vizsgálata ezzel a módszerrel, meglehetősen körülményes (Dolferus és mtsai, 1994). A luciferáz enzim aktivitás mérésekor a növények sértetlenek maradnak, ezért ez a módszer kiválóan alkalmas a promóter működésének időbeli tanulmányozására. Az *ADH-LUC* vonalban a riportergén aktivitása, ABS és stressz kezelések hatására is megnövekedett, a gyökérben és a hajtásban egyaránt. Az ABS kezelés az *ADHI-LUC* riportergén gyorsabb aktivációját eredményezte, mint a különböző stresszkezelések, ez abból ered, hogy az ABS a stressz válaszok közvetítésében játszik szerepet (Finkelstein és mtsai, 2002).

A rendszerünk másik eleme az *ADH-LUC* növényi vonalakba jutatott random cDNS könyvtár volt, melynek túltermelése exogén úton, kémiaiilag szabályozható, így az egyes cDNS-ekről átíródó fehérjék nincsennek folyamatosan túltermelve. A cDNS könyvtár elkészítésénél a Gateway klónozó stratégiát alkalmaztuk, ami megkönnyítette a munkánkat, és további előnyt biztosít azzal, hogy lehetőség nyílik a PCR reakcióval azonosított cDNS-ek egyszerű, egylépéses enzimreakcióval történő klónozására. A cDNS aktiváció feltételelesen domináns fenotípushoz vezethet, így alkalmas stressz válaszok pozitív szabályzásában szerepet játszó gének funkciójának tanulmányozására.

Az *ADHI-LUC* transz-aktivációjáért felelős faktorok keresése sikerrel járt. Két vonalat azonosítottunk, amelyben az ösztadiol indukált cDNS túltermelés a luciferáz aktivitást fokozta stressz mentes körülmények között. Az egyik vonal (ADH/121) jellemzése során kiderült, hogy az indukált cDNS, egy eddig nem jellemzett AP2/ERF típusú transzkripciós faktort kódol. Bebizonyítottuk, hogy az ösztadiol indukcióval túltermelt RAP2.12 cDNS az *ADHI* promótert aktiválja, és ez az ADH1 mRNS mennyiségének illetve az ADH1 enzim aktivitásának növekedését is előidézi.

Az *ADHI* gén a különböző stressz körülmények hatására nagymértékben aktiválódik, ugyanakkor alacsony szintű kifejeződése mindig kimutatható. Chung és munkatársai az *ADHI-GUS* riportergén folyamatos, alacsony szintű működéséről számoltak be stressz mentes körülmények között, agaróz táptalajon nőtt Arabidopsis növények gyökerében. Ennek oka az, hogy a táptalajban a gyökerek oxigén hiányos környezetben vannak, ez pedig az *ADHI* gént aktiválja (Olive és mtsai, 1991). Amikor a növényeket függőlegesen helyezett petri-csészékben növesztették, és a gyökerek a függőleges helyzetű táptalaj felszínén növekedtek, nem volt kimutatható *ADHI-GUS* riportergén aktivitás (Chung és Ferl, 1999). A kísérleteink során mi is ezt a módszert alkalmaztuk, hogy elkerüljük gyökerek hipoxia által kiváltott *ADHI* működését. Azonban az luciferáz enzim működésének CCD kamerával való nyomon követése nagyon érzékeny, az ADH-LUC vonalak alacsony fokú biolumineszcenciája így is mérhető volt. Amikor a növényeket ABS-el kezeltük vagy egyéb stressz körülményeket biztosítottunk, az *ADHI-LUC* riportergén aktivitása többszörösére növekedett, de a RAP2.12 cDNS által indukált luciferáz aktivitás ennél kisebb volt. Tulajdonképpen a RAP2.12 cDNS ösztadiol indukcióját követő luciferáz aktivitás időbeni változásai szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy a cDNS túltermelése okozza az *ADHI-LUC* megnövekedett aktivitását. Több olyan cDNS-t tartalmazó vonalat is azonosítottunk, melyekben megnövekedett luciferáz aktivitást mértünk, azonban ezek függetlenek voltak az ösztadiol kezeléstől.

A dolgozatomban arról számoltam be, hogyan alkalmaztuk a pER8-GW/cDNS könyvtárat az *ADHI-LUC* riportergént transz-aktiváló gének keresésére. Azonban a cDNS könyvtár alkalmazása ennél sokkal több lehetőséget rejt magában. Munkatársaim vad típusú Arabidopsis növényekbe transzformálták a pER8-GW/cDNS könyvtár konstrukciót és a következő generációban olyan csíranövényeket kerestek, melyek képesek voltak ABS vagy magas só koncentrációjú táptalajon csírázni és növekedni, ösztadiol jelenlétében. Számos vonalat találtak, melyek ABS érzéketlen csírázással

bírtak vagy megnövekedett NaCl toleranciát mutattak. A fenotípusok minden esetben az ösztradiol indukciótól függttek (Papdi és mtsai, 2008). Az indukált cDNS könyvtár túltermelés, a stressz válaszokhoz kapcsolt gének azonosítása mellett - megfelelő szelekciós módszer kidolgozását követően - alkalmas lehet számos élettani folyamatban szerepet játszó gén azonosítására is.

A gének azonosítására alkalmas genetikai módszerek közül sok tekintetben a cDNS túltermelő rendszer a legelőnyösebb. A klasszikus vagy inszerciós mutagenézisen alapuló technológiát alkalmazva a gének funkciójának megváltozásán vagy elvesztésén keresztül azonosíthatunk bizonyos géneket. Azonban ezekkel a módszerekkel nem azonosíthatók azok a gének, melyek géncsaládokba tartoznak és a géncsalád több tagja is hasonló funkciókat lát el. A funkció-nyeréses mutagenézisen alapuló aktiváció-jelölés hatékony módszer gének azonosítására, azonban a fenotípust előidéző valódi genetikai okok nem mindig egyértelműek. Ez abból ered, hogy a genomba beépült promóter vagy enhanszer elemek több környező gén kifejeződését is befolyásolhatják, így a mutáns fenotípusa több gén megváltozott működésének lesz az eredménye. Egy másik érv ami az aktiváció-jelöléssel szemben a cDNS könyvtár túltermelés előnyére szól az, hogy itt az adott génnek mindig csak egy *splice*-variánsát termeljük túl. Ez azért fontos, mert az alternatív *splicing* mint poszt-transzkripcionális szabályzó mechanizmus, a képződő fehérje funkcióját módosíthatja.

A pER8-GW vektor biztosította számunkra, hogy a cDNS könyvtár túltermelése kémiaiilag indukálható legyen és ennek több előnye van. A szabályozott működéssel lehetőségünk van a fenotípus egyértelmű azonosítására, hiszen egy adott vonal esetében a nem indukált növények közvetlenül használhatók negatív kontrollként. Lehetőség nyílik arra, hogy a cDNS kifejeződésének hatását csak bizonyos fejlődési állapotokban vizsgálhassuk. A transzkripciós faktorok funkcióját sokszor meghatározza az, hogy milyen kölcsönható fehérjék van jelen az adott pillanatban. A transzkripciós faktorok általában egy komplex részeként vesznek részt adott gének aktiválásában, tehát nem mindig elég a transzkripciós faktort kódoló cDNS túltermelése ahhoz, hogy egy célgén működését beindítsuk. Egy bizonyos funkció azonosításában segítségünkre lehet, ha a cDNS túltermelését csak az adott fejlődési szakaszban kapcsoljuk be. A konstitutív cDNS túltermelésnél az is előfordulhat, hogy a folyamatosan magas szinten kifejeződő fehérje abnormális fejlődést okoz, ami akár sterilításhoz is vezethet (Kasuga és mtsai, 1999).

6.2 AZ ERF TÍPUSÚ TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK SZEREPE AZ ADHI GÉNMŰKÖDÉS SZABÁLYOZÁSÁBAN

A RAP2.12 cDNS túltermelése az ADH/121 vonalban gyengén aktiválta az *ADHI-LUC* gént, viszont az ABS, a NaCl vagy a mannitol kezelésekkkel kombinálva a riporter gént nagy mértékű aktivációját váltotta ki, amely sokáig magas szinten fennmaradt (szinergisztikus hatás). A kísérleteink alapján a *RAP2.12* gén nem indukálódik ABS kezelés hatására. Az *ADHI* promóter stressz és ABS aktiválta szabályozásáért felelős transzkripciós faktorok közül néhányat már azonosítottak. Ezek MYB, bZIP, bHLH típusú fehérjék, és a kötőhelyeik is ismertek (GC, GT, G-Box motívumok) (Abe és mtsai, 2003; Hoeren és mtsai, 1998; Kang és mtsai, 2002; McKendree és mtsai, 1990). AP2/ERF típusú faktorok és *ADHI* gén működés szabályozásának kapcsolatáról még nem született publikáció.

A RAP2.12 transzkripciós faktorról szekvencia homológiát mutató RAP2.2 és RAP2.3 cDNS-ének túltermelése szintén kiváltotta az *ADH-LUC* riporter gént aktivációját. A *RAP2.2*, *RAP2.3* és *RAP2.12* gének termékei az AP2/ERF (*Apetala 2 / ethylene response factor*) család ERF, azaz etilén válasz faktorok alcsaládjába tartoznak. Ennek az alcsaládnak sok tagja etilénre indukálódik és az etilén közvetítette válaszokban játszik szerepet (Ohme-Takagi és Shinshi, 1995). Az ADH-LUC vonal luciferáz aktivitását etilén kezeléssel nem tudtuk kiváltani (az erre vonatkozó adatokat, nem mutattam be), emellett a Genevestigator adatai szerint sincs az etilénnek közvetlen hatása az *ADHI* gén aktivitására (Zimmermann és mtsai, 2004). Számos ERF transzkripciós faktor bizonyítottan kötődni képes a GCC motívumhoz (TAAGAGCCGCC), azaz etilén válasz elemhez (Fujimoto és mtsai, 2000). A *RAP2.3 (AtEBP)* gént etilén indukálja és a RAP2.3 fehérje képes a GCC elemhez kötődni (Buttner és Singh, 1997). A Genevestigator adatai szerint a *RAP2.2* és *RAP2.3* gének egyaránt aktiválódnak etilén kezelés hatására, ugyanakkor a RAP2.12 nem. Az *ADHI* promóter szekvencia analízise során nem találtuk meg a konzervált GCC motívumot. Egy tanulmány arról számolt be, hogy az RAP2.3 túltermelése az AP2 és ERF1 transzkriptek mennyiségének növekedését idézte elő Arabidopsisban, pedig ezek nem tartalmazzák a GCC elemet, és nem indukálódnak etilénre sem (Ogawa és mtsai, 2007). A paradicsom ERF típusú transzkripciós faktor, a Pti1 kötődni képes olyan promóterekhez melyek tartalmazzák, és olyanokkal is melyek nem tartalmazzák a GCC motívumot. Habár a Pti1 kötőhelyet nem sikerült azonosítani azokon a promótereken melyeken nem található GCC elem, az

feltűnt, hogy ezeken nagy arányban előfordulnak a G-Box motívumok és különböző MYB transzkripció faktor kötő helyek (Chakravarthy és mtsai, 2003). A RAP2.3 fehérje jellemzése során azonosítottak egy fehérje kölcsönható partnert a bZIP típusú OBF4 (ocs element binding factor 4) transzkripció faktort (Buttner és Singh, 1997). Az OBF transzkripció faktorok főleg patogén fertőzések elleni, védekezési válaszokban vesznek részt, egy jellegzetes 20 bp hosszúságú promóter szekvenciához kötődnek, az ocs (octopine synthase) elemhez (Foley és mtsai, 1993).

A RAP2.2 transzkripció faktor jellemzése során kiderült, hogy szerepet játszik a karotenogenezis szabályozásában, ugyanis aktiválja a fitoén-szintáz enzimet kódoló gént. Fény derült arra, hogy funkciója létfontosságú a növény fennmaradása szempontjából, hiszen a *RAP2.2* mutációja letalitást okoz. Azonosítottak egy öt nukleotidos szekvencia részt (ATCTA) a fitoén-szintáz promóterében, amihez a RAP2.2 specifikusan kötődik (Welsch és mtsai, 2007). Az ADH1 promóterében is megtaláltuk ezt a motívumot.

Kiséreleteinkből kiderült, hogy az indukált RAP2.12 cDNS terméke akkor is képes az *ADH-GUS* aktiválására, amikor a promóter az ismert GT, GC, G-box transzkripció faktor kötőhelyeket nem tartalmazta. Mindezekből arra következtettünk, hogy a RAP2 típusú transzkripció faktorok nem ezeken a helyeken keresztül aktiválják az ADH1 promóterét.

A RAP2.3 transzkripció faktor fehérje-fehérje kölcsönhatásra képes az OBF4 bZIP faktorról, elképzelhető, hogy az *ADH1* promóter kötő bZIP faktorokkal is kölcsönhat. Több promóter szabályozásában a MYB és bZIP transzkripció faktorok együtt szükségesek az ABS általi gén aktivációhoz, ez a két transzkripció faktor együttműködésével létrejövő kombinatórikus szabályozásra utal (Abe és mtsai, 2003). Chakravarthy és munkatársai eredményei alapján feltételezhető, hogy az ERF típusú faktorok nem GCC specifikus promóter kötése, egy eddig ismeretlen kötőhelyen történik és a génműködés szabályozását bZIP és MYB típusú faktorokkal kölcsönhatásban végzi (Chakravarthy és mtsai, 2003). Az *ADH1* gént a bZIP faktorok különböző alcsaládjaiba tartozó fehérjék túltermelése képes aktiválni (Kang és mtsai, 2002; McKendree és mtsai, 1990). Az eredményeink alapján, úgy gondoljuk, hogy az *ADH1* összetett transzkripcionális szabályozásában és így a stresszválaszok molekuláris szintű szabályozásában az ERF típusú transzkripció faktorok is fontos szerepet töltenek be.

A dolgozatomban említettem, hogy az ADH/121 mellett találtunk egy másik vonalat is (ADH/242), amelyben az ösztradiol kezelés a riporter gént aktiválta. Az ADH/242 vonalban azonosítottuk a fenotípust okozó cDNS inszertet, ami egy ismeretlen

zinc finger (C2H2) típusú transzkripciós faktort kódol. Amennyiben az *ADH1* génműködés szabályozásában *zinc finger* faktorok is részt vesznek, az méginkább alátámasztja azt a tényt, hogy stressz válaszok transzkripcionális szabályozása egy komplex mechanizmuson keresztül valósul meg és jelenleg ennek csupán néhány részletét ismerjük.

7 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani a kísérleti eredményeim elérésében nyújtott segítségért témavezetőmnak Dr. Szabados Lászlónak és az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport jelenlegi és korábbi munkatársainak, kiemelve Dr. Ábrahám Editet, Dr. Cristina Popescu-t, Király Annamáriát és Rigó Gábort.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Koncz Csabának az értékes szakmai tanácsaiért, Dr. Vass Imrének és Dr. Dudits Dénesnek, hogy kutatásaimat lehetővé tették az SZBK Növénybiológia Intézetében.

Köszönöm Dr. Kozma-Bognár Lászlónak a dolgozatom tudományos bírálatát, értékes megjegyzéseit, észrevételeit és javaslatait.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek, családomnak és Immának minden támogatásért.

8 IRODALOMJEGYZÉK

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-68.

Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**, 1263-74.

Allen, G. J., Kuchitsu, K., Chu, S. P., Murata, Y. and Schroeder, J. I. (1999). Arabidopsis abi1-1 and abi2-1 phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* **11**, 1785-98.

Assmann, S. M. (2003). OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells. *Trends Plant Sci* **8**, 151-3.

Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q. W. and Chua, N. H. (2001). Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* **13**, 2609-18.

Baud, S. and Graham, I. A. (2006). A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of Arabidopsis using in situ histochemistry. *Plant J* **46**, 155-69.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-63.

Baxter-Burrell, A., Chang, R., Springer, P. and Bailey-Serres, J. (2003). Gene and enhancer trap transposable elements reveal oxygen deprivation-regulated genes and their complex patterns of expression in Arabidopsis. *Ann Bot* **91 Spec No**, 129-41.

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **276**, 40381-4.

Braam, J. and Davis, R. W. (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell* **60**, 357-64.

Bray, E. A. (1993). Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol* **103**, 1035-1040.

Bray, E. A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stress. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.

Buttner, M. and Singh, K. B. (1997). Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5961-6.

Cao, W. H., Liu, J., Zhou, Q. Y., Cao, Y. R., Zheng, S. F., Du, B. X., Zhang, J. S. and Chen, S. Y. (2006). Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plant responses to salt stress. *Plant Cell Environ* **29**, 1210-9.

Cao, Y. R., Chen, S. Y. and Zhang, J. S. (2008). Ethylene signaling regulates salt stress response: An overview. *Plant Signal Behav* **3**, 761-3.

Chakravarthy, S., Tuori, R. P., D'Ascenzo, M. D., Fobert, P. R., Despres, C. and Martin, G. B. (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**, 3033-50.

Chen, J. G., Pandey, S., Huang, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Assmann, S. M. and Jones, A. M. (2004). GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol* **135**, 907-15.

Cheong, Y. H., Kim, K. N., Pandey, G. K., Gupta, R., Grant, J. J. and Luan, S. (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1833-45.

Chin, H. G., Choe, M. S., Lee, S. H., Park, S. H., Koo, J. C., Kim, N. Y., Lee, J. J., Oh, B. G., Yi, G. H., Kim, S. C. és mtsai (1999). Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J* **19**, 615-23.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.

Chung, H. J. and Ferl, R. J. (1999). Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiol* **121**, 429-36.

Clough, S. J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-43.

de Bruxelles, G. L., Peacock, W. J., Dennis, E. S. and Dolferus, R. (1996). Absciscic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* **111**, 381-91.

Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Physiol* **105**, 1075-87.

Duckham, S. C., Linfort, R. S. T., Taylor, I. B., (1990). Absciscic-acid-deficient mutants at the aba gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant, Cell & Environment* **14**, 601-606.

Feldmann, K. A., Malmberg, R.L., Dean, C. (1994). Mutagenesis in *Arabidopsis*. In *Arabidopsis*, (ed. C. R. S. Elliot M. Meyerowitz): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ferl, R. J., Laughner, B.H. (1989). In vivo detection of regulatory factor binding sites of *Arabidopsis thaliana* Adh. *Plant Mol Biol* **12**, 357-366.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. and Rock, C. D. (2002). Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**, S15-45.

Finkelstein, R. R., Rock, C. D. (2002). Absciscic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.

Foley, R. C., Grossman, C., Ellis, J. G., Llewellyn, D. J., Dennis, E. S., Peacock, W. J. and Singh, K. B. (1993). Isolation of a maize bZIP protein subfamily: candidates for the ocs-element transcription factor. *Plant J* **3**, 669-79.

Fujii, H., Verslues, P. E. and Zhu, J. K. (2007). Identification of two protein kinases required for absciscic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 485-94.

Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.

Fujita, F., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri T., Kidokoro, S., Umezawa, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. . (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of absciscic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology* **50**, 2123-2132.

Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Matsui, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 250-7.

Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H. M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-61.

Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J. K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* **111**, 803-14.

Grant, J. J., Chini, A., Basu, D. and Loake, G. J. (2003). Targeted activation tagging of the *Arabidopsis* NBS-LRR gene, ADR1, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 669-80.

Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R., Jr. and Quatrano, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**, 267-71.

Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3735-40.

Harding, S. A., Oh, S. H. and Roberts, D. M. (1997). Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J* **16**, 1137-44.

Heyl, A. and Schmulling, T. (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 480-8.

Hirayama, T., Ishida, C., Kuromori, T., Obata, S., Shimoda, C., Yamamoto, M., Shinozaki, K. and Ohto, C. (1997). Functional cloning of a cDNA encoding Mei2-like protein from Arabidopsis thaliana using a fission yeast pheromone receptor deficient mutant. *FEBS Lett* **413**, 16-20.

Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T. and Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3903-7.

Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* **12**, 343-51.

Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. (1998). Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* **149**, 479-90.

Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H., Kondou, Y., Tsubara, Y., Suzuki, K., Ishikawa, A., Seki, M. és mtsai (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J* **48**, 974-85.

Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**, 1667-78.

Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J. K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* **9**, 1935-49.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2000). A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol* **123**, 553-62.

Johnson, P. R. and Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet* **32**, 227-54.

Kakimoto, T. (1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-5.

Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y. and Kim, S. Y. (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**, 343-57.

Kapoor, A., Agarwal, M., Andreucci, A., Zheng, X., Gong, Z., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. and Zhu, J. K. (2005). Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in Arabidopsis. *Curr Biol* **15**, 1912-8.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* **17**, 287-91.

Kizis, D., Lumberras, V. and Pages, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* **498**, 187-9.

Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H., Redei, G. P. and Schell, J. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8467-71.

Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J. (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, vol. B2, pp. 1-22. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet*, 383-396.

Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G. and Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2940-5.

Krysan, P. J., Young, J. C. and Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2283-90.

Lazarow, K. and Lutticke, S. (2009). An Ac/Ds-mediated gene trap system for functional genomics in barley. *BMC Genomics* **10**, 55.

LeClere, S. and Bartel, B. (2001). A library of Arabidopsis 35S-cDNA lines for identifying novel mutants. *Plant Mol Biol* **46**, 695-703.

Lee, J. H., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. (1999). A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5873-7.

Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M. and Lee, I. J. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**, 1109-20.

Lee, S., Hirt, H. and Lee, Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J* **26**, 479-86.

Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P. C., Guerrier, D., Cheddor, F. and Giraudat, J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**, 1448-52.

Ligterink, W. and Hirt, H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol* **201**, 209-75.

Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3730-4.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and 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**, 1391-406.

Lopez-Molina, L., Mongrand, S. and Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4782-7.

Luan, S. (1998). Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends in plant science* **3**, 271-275.

Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. and Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**, S389-400.

Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. and Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana. *EMBO J* **15**, 2331-42.

Martienssen, R. A. (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2021-6.

Mathur, J., Koncz, C. (1998). Establishment and maintenance of cell suspensions. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 82, pp. 27-30. Totowa: Humana Press.

McKendree, W. L., Paul, A. L., DeLisle, A. J. and Ferl, R. J. (1990). In vivo and in vitro characterization of protein interactions with the dyad G-box of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Cell* **2**, 207-14.

Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y. and Levy, A. A. (2000). Technical advance: a high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J* **22**, 265-74.

Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. and 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**, 295-303.

Mikami, K., Katagiri, T., Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998). A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**, 563-8.

Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszynska, G., Klessig, D. F. and 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**, 165-78.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 405-10.

Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H. J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y. és mtsai (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**, 609-14.

Munnik, T., Meijer, H. J., Ter Riet, B., Hirt, H., Frank, W., Bartels, D. and Musgrave, A. (2000). Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* **22**, 147-54.

Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 651-81.

Nakashima, K., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1997). A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**, 851-61.

Nakazawa, M., Ichikawa, T., Ishikawa, A., Kobayashi, H., Tsuchida, Y., Kawashima, M., Suzuki, K., Muto, S. and Matsui, M. (2003). Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. *Plant J* **34**, 741-50.

Neill, S. J., Burnett, E.C., Desikan, R., Hancock, J.T. (1998). Cloning of a wilt-responsive cDNA from an *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1393-1894.

Ogawa, T., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2007). Mutual regulation of *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein and a plant floral homeotic gene, *APETALA2*. *Ann Bot* **99**, 239-44.

Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-82.

Olive, M. R., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. (1991). The anaerobic responsive element contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize Adh1 promoter. *Nucleic Acids Res* **19**, 7053-60.

Olive, M. R., Walker, J. C., Singh, K., Ellis, J.G., Llewellyn, D., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (1991). The anaerobic responsive element. *Plant Mol Biol* **2**, 673-684.

Papdi, C., Abraham, E., Joseph, M. P., Popescu, C., Koncz, C. and Szabados, L. (2008). Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* **147**, 528-42.

Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F. and Tardieu, F. (2009). Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiol* **149**, 2000-12.

Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W. C., Kumaran, M. and Sundaresan, V. (1999). Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2263-70.

Parkinson, J. S. and Kofoid, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**, 71-112.

Paz-Ares, J. and The Regia, C. (2002). REGIA, An EU Project on Functional Genomics of Transcription Factors From Arabidopsis Thaliana. *Comp Funct Genomics* **3**, 102-8.

Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C. and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**, 865-75.

Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8436-41.

Rédei, G. P. (1992). Classical mutagenesis. In *Methods in Arabidopsis Research*, (ed. N. H. C. Csaba Koncz, Jeff Schell). Singapore: World Scientific.

Remy, S., Thiry, E., Coemans, B., Windelinckx, S., Swennen, R. and Sagi, L. (2005). Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. *Biotechniques* **38**, 763-70.

Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R. and Kwon, J. (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**, pe1.

Rodriguez, P. L., Benning, G. and Grill, E. (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* **421**, 185-90.

Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T. M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R. J., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. and Maggio, A. (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**, 3134-47.

Sachs, M. M., Freeling, M. and Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell* **20**, 761-7.

Saijo, Y., Hata, S., Kyoizuka, J., Shimamoto, K. and Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* **23**, 319-27.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 998-1009.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaller, G. E., Kieber, J. J. (2002). Ethylene. In *The Arabidopsis book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.

Schroeder, J. I., Kwak, J. M. and Allen, G. J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**, 327-30.

Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. and McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-4.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y. és mtsai (2002). Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* **296**, 141-5.

Seo, M., Peeters, A. J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12908-13.

Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C. és mtsai (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-94.

Sharp, R. E. and LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot* **53**, 33-7.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6896-901.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol* **115**, 327-334.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 217-23.

Singh, K. K. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med* **29**, 1043-50.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. and 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 Natl Acad Sci U S A* **94**, 1035-40.

Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C. and Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. *Plant J* **12**, 557-69.

Sussman, M. R., Amasino, R. M., Young, J. C., Krysan, P. J. and Austin-Phillips, S. (2000). The Arabidopsis knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol* **124**, 1465-7.

Teeri, T. H., Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Palva, E. T. (1986). Identification of plant promoters in situ by T-DNA-mediated transcriptional fusions to the npt-II gene. *EMBO J* **5**, 1755-1760.

Thomashow, M. F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571-599.

Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**, 2481-98.

Tran, L. S., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20623-8.

Tuteja, N. (2007). Absciscic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* **2**, 135-8.

Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Shinozaki, K. (2006). CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **46**, 171-82.

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11632-7.

Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N. and Shinozaki, K. (1994). Two genes that encode Ca(2+)-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **244**, 331-40.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743-54.

Walker, J. C., Howard, E. A., Dennis, E. S. and Peacock, W. J. (1987). DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6624-6628.

Walkerpeach, C. R., Velten, J., . (1994). Agrobacterium-mediated gene transfer to plants: cointegrate and binary vector system. In *Plant Molecular Biology Manual*, vol. B1, pp. 1-19. Dodrecht, The Netherlands Kluwer Academic Publisher.

Weigel, D., Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., Dellapenna, D. and Beyer, P. (2007). Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **145**, 1073-85.

Wu, S. J., Ding, L. and Zhu, J. K. (1996). SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *Plant Cell* **8**, 617-627.

Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R. and Chua, N. H. (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**, 2126-30.

Xiong, L., Lee, B., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J. K. (2001). FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **15**, 1971-84.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-64.

Yamamoto, Y. Y., Tsuchida, Y., Gohda, K., Suzuki, K. and Matsui, M. (2003). Gene trapping of the *Arabidopsis* genome with a firefly luciferase reporter. *Plant J* **35**, 273-83.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F. and Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**, 5310-8.

Zhang, J., Davies, W. J. . (1991). Antitranspirant activity in xylem sap of maize plants *Journal of Experimental Botany* **42**, 317-321.

Zhang, J. S., Xie, C., Shen, Y. G., Chen, S. Y. (2001). A two-component gene (NTHK1) encoding a putative ethylene-receptor homolog is both developmentally and stress regulated in tobacco. *Theor Appl Genet* **102**, 815-824.

Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W. X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C. S. and Zhu, J. K. (2008). ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature* **455**, 1259-62.

Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J. K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J* **26**, 1691-701.

Zhu, J., Jeong, J. C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., Bohnert, H. J., Shi, H., Yun, D. J. és mtsai (2008). Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4945-50.

Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-73.

Zhu, Y. Y., Machleder, E.M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P.D. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* **30**, 892-897.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-32.

Zuo, J., Niu, Q. W. and Chua, N. H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**, 265-73.

Zupan, J. R. and Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. *Plant Physiol* **107**, 1041-7.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

Egy új, hatékony genetikai stratégiát fejlesztettünk ki, mely alkalmas az Arabidopsis stressz választ szabályzó ismeretlen gének azonosítására. Létrehoztunk egy Arabidopsis cDNS könyvtárat, és az ösztadiol indukálható pER8-GW plazmidba klónoztuk. A pER8-GW/cDNS könyvtárat Agrobaktérium sejtekbe transzformáltuk, így alkalmassá vált, növények genetikai transzformációjára. Véletlenszerűen kiválasztott cDNS-ek megszekvenálása szerint a cDNS populáció több mint a fele teljes hosszúságú. A későbbiekben további cDNS-ek megszekvenálásával hasonló arányokat kaptunk.

A specifikus stressz jelátvitel közvetítésének tanulmányozása céljából, előállítottuk az *ADHI-LUC* riporter gént, amiben a stressz és ABS indukálható Arabidopsis *alkohol dehidrogenáz 1 (ADHI)* gén promóterét a szentjánosbogár luciferáz génnel kapcsoltuk össze. Transzgenikus Arabidopsis növényeket állítottunk elő, melyek tartalmazták az *ADHI-LUC* gént, és utódaikból olyan vonalakat kerestünk, melyek ABS kezelés hatására riporter gént aktivitást mutattak. Kiválasztottuk a 16-os vonalat, ami ABS kezelés nélkül viszonylag alacsony luciferáz aktivitást mutatott, viszont ABS kezelés hatására a mérhető biolumineszcencia szintje nagymértékben felerősödött. Ebből a vonalból homozigóta vonalat (ADH-LUC) állítottunk elő. Az ADH-LUC vonal további tesztelése során, az ABS kezelés mellett a NaCl, mannitol, szacharóz és hidrogén-peroxid kezelésekkkel is elő tudtuk idézni a luciferáz aktivitás nagymértékű növekedését. Az ABS kezelés és stressz hatására bekövetkező biolumineszcencia változások hasonló jellegűek voltak, azonban az ABS gyorsabban váltotta ki a riporter gént aktivitásának növekedését.

Az *ADHI* gén transzkripció szabályozásában résztvevő gének azonosítása érdekében az *ADHI-LUC* riporter gént hordozó ADH-LUC vonalat transzformáltuk az indukálható expressziójú cDNS könyvtárral. A utódgenerációban olyan növényeket kerestünk, melyben az *ADHI-LUC* riporter gént aktivitását, ABS vagy stressz hatás nélkül is indukálta az ösztadiol kezelés. Több transzformált vonalat találtunk megnövekedett

luciferáz aktivitással. Két vonalat azonosítottunk, melyekben a riporter gén működés változása egyértelműen a cDNS ösztadiol általi indukciójától függött.

Az ADH/121 vonal biolumineszcenciája ABS kezelés után hasonló módon növekedett mint a cDNS inszerciót nem tartalmazó ADH-LUC vonalban. Az ösztadiol hatására azonban a luciferáz aktivitás fokozódás lassabb és eltérő jellegű volt. Az ABS és ösztadiol kombinált kezelések a riporter gén működésének nagymértékű növekedését idézték elő, amely sokáig fennmaradt, ún. szinergisztikus hatásuk volt. Valós idejű RT-PCR-rel bebizonyítottuk, hogy az ADH/121 növények ABS és ösztadiol kezelése az *ADH1* mRNS mennyiségét is megnöveli. Hisztokémiai festéssel kimutattuk, hogy az indukált cDNS fokozta az ADH1 enzim működését.

Azonosítottuk az ADH/121 vonal cDNS inszertjét. A cDNS a RAP2.12 (related to apetala 2) fehérjét kódolja, ami egy AP2/ERF típusú transzkripciós faktor. A RAP2.12 hatásának további teszteléséhez a megklónozott cDNS-t ismét pER8-GW expressziós vektorba építettük és növényekbe transzformáltuk. Az utódok vizsgálata során, az ösztadiol kezelés következtében hasonló riporter gén aktivációt tapasztaltunk, mint amilyet az ADH/121 vonal esetében láttunk.

Szemikvantitatív RT-PCR reakcióval bemutattuk, hogy az ADH/121 vonalban a RAP.12 mRNS szintje ösztadiol függően emelkedik, de az ABS kezelés nem indukálja.

Az *ADH1* promóter és a RAP2.12 faktor kölcsönhatásának tanulmányozása érdekében az ADH/121 növényeket olyan *ADH1-GUS* riporter gén konstrukciókat tartalmazó növényekkel kereszteztük, melyekben a GUS riporter gén elé épített ADH1 promóter ismert transzkripciós faktor kötőhelyeit elrontották vagy deléciókkal eltávolították. Az ösztadiol indukció GT, GC és G-BOX elemek hiányában is képes volt az *ADH1* promóter vezérelt GUS enzimaktivitás kiváltására.

A RAP2.12 fehérjével nagy szekvencia homológiát mutató RAP2.2 és RAP2.3 fehérjét kódoló cDNS-eket elkértük a REGIA Arabidopsis transzkripciós faktor gyűjteményből, pER8-GW expressziós faktorba klónoztuk őket és ADH-LUC növényekbe transzformáltuk. A RAP2.2 és RAP2.3 faktorok is képesek voltak a riporter gén aktivitás fokozására ösztadiol indukciót követően, ami arra utal, hogy a géncsalád többi tagjának biológiai funkciója hasonló, illetve átfedő lehet.

A Genevestigator *microarray* adatbázisban közétett adatok alapján, összehasonlítottuk az Arabidopsis különböző szerveiben, szöveteiben és fejlődési állapotában, illetve különböző hormon és stressz kezelések után detektált *RAP2.2*, *RAP2.3* és *RAP2.12* gének kifejeződésének mintázatát. A *RAP2.3* nagyon alacsonyan

fejeződik ki a növény fejlődésének különböző szakaszaiban, és a különböző szervekben, szövetekben egyaránt. A *RAP2.2* és *RAP2.12* génkifejeződés mintázata nagyon hasonló szerv és szövet szinten, főleg az érett és csírázó magokban, a hipokotilban és levélszárban fejeződnek ki. Az etilén kezelés a *RAP2.2* és *RAP2.3* gének kifejeződését indukálja a *RAP2.12*-ét nem.

Az eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az ERF típusú transzkripciós faktorok is részt vesznek az *ADH1* stressz válasz gén transzkripcionális szabályozásában.

10 SUMMARY

A novel genetic strategy was developed, which is suitable for the identification of unknown genes regulating stress responses of Arabidopsis. An Arabidopsis cDNA library was constructed and cloned into the estradiol inducible pER8-GW plant expression vector. Subsequently, the pER-GW/cDNA library was transformed into competent *Agrobacterium* cells and was used for genetic transformation of Arabidopsis plants. After sequencing randomly selected cDNAs we concluded, that more than half of the cDNA population are full-length.

To investigate the regulation of specific stress signaling events, the *ADHI-LUC* reporter gene was constructed, in which the promoter of the Arabidopsis *alcohol dehydrogenase 1* (*ADHI*) was fused to the firefly luciferase gene. Transgenic Arabidopsis lines were generated carrying single locus insertions of *ADHI-LUC* reporter construct, and their reporter gene activity was tested based on ABA treatment. The line number 16 was selected, in which the basal *ADHI-LUC* activity was low, under standard culture conditions, whereas the treatment of seedlings with 20 μ M ABA, 200mM NaCl, 400mM sucrose, 300mM mannitol or 10mM hydrogen peroxide resulted in reproducible, high level induction of light emission due to the activation of *ADHI-LUC* reporter. The ADH-LUC line showed a similar pattern of luciferase expression in response to ABA and during stress conditions, which started with transient increase in bioluminescence, followed by gradual decrease in *ADHI-LUC* expression within 3 to 4 hours. Interestingly, the ABA treatment caused faster increase in reporter gene activity than other stress conditions.

To perform genetic screens for the identification of novel factors involved in transcriptional regulation of *ADHI* gene, the ADH-LUC line was transformed with the inducible cDNA library. 20,000 hygromycin resistant T1 seedlings were screened and 11 plants were identified displaying enhanced luciferase activity. Further, testing of these lines confirmed, that 2 of them had estradiol dependent changes in bioluminescence intensity. One of the 2 lines, ADH/121 was chosen for further characterization. ADH/121 line showed gradual increase in bioluminescence after estradiol treatment

alone. However, combined with 20 μ M ABA caused sustained reporter gene activity for at least 24 hours. In a similar experiment, in the presence of estradiol, transfer of ADH/121 seedlings to culture media supplemented with 200mM NaCl or 300mM mannitol displayed persistent maintenance of high-level luciferase expression for at least 16 hours. However, the parental ADH1-LUC seedlings showed only transient increase in bioluminescence within 3 to 4 hours followed by gradual decrease of *ADH1-LUC* expression in response to combined treatment with either 20 μ M ABA and estradiol or 200mM NaCl and estradiol.

To compare the induction of endogenous *ADH1* gene with activation of the *ADH1-LUC* reporter construct, the ABA and estradiol induced changes were monitored in ADH1 mRNA levels by quantitative RT-PCR, in the ADH/121 line. Combination of estradiol with ABA treatment resulted in increased ADH1 mRNA levels as seen on ABA induction, but the transcript levels failed to decline even 24 hours after the induction. Histochemical staining based on alcohol dehydrogenase activity showed that the induced cDNA could enhance the endogenous ADH enzyme activity.

PCR amplification and sequence analysis revealed that a single pER8-GW T- DNA insert in the ADH/121 line carried a full-length cDNA of the *Atlg53910* gene encoding RAP2.12, a yet uncharacterized member of AP2/ERF (ethylene responsive element binding factor) transcription factor family.

To confirm that the estradiol-inducible activation of RAP2.12 transcription was indeed responsible for the activation of the ADH1-LUC reporter in the ADH/121 line, the isolated cDNA was recloned into the pER8-GW vector and transformed into the parental ADH1-LUC line again. Most of the ADH1-LUC transformants (10 out of 13) carrying the pER8GW-RAP2.12 construct showed estradiol-inducible luciferase activity, which was similar to the activity of the ADH/121 line.

To determine whether RAP2.12 expression correlates with the induction of ADH1-LUC reporter, RAP2.12 mRNA levels were monitored by RT-PCR in the parental ADH1-LUC and the cDNA containing ADH/121 lines. High levels of RAP2.12 transcript were detected only in the estradiol-treated ADH/121 seedlings.

To investigate the interaction between of the *ADH1* promoter and the RAP2.12 transcription factor, transgenic Arabidopsis lines carrying point mutated or deleted promoter-binding sites containing *ADH1-GUS* constructs were crossed with the ADH/121 plants. Estradiol induction was able to activate the *ADH1* promoter regulated GUS enzyme activity in the absence of GT, GC, G-Box promoter elements, respectively,

suggesting that none of these promoter elements are responsible for RAP2.12 mediated activation of *ADH1*.

cDNA molecules encoding the transcription factors RAP2.2 and RAP2.3 showing high sequence similarity to RAP2.12 were cloned into pER8-GW expression vector and transformed into ADH-LUC plants. Both of them could induce the ADH1-LUC activity upon estradiol treatment. This indicates that the biological function of the members of this gene subfamily can be similar or overlapping.

Microarray data published in the Genevestigator database were used for comparing the gene expression patterns of *RAP2.2*, *RAP2.3* and *RAP2.12* in the different organs, tissues and developmental stages of Arabidopsis plants. *RAP2.3* has low expression level in different organs and tissues at any developmental stages. However, the expression pattern of *RAP2.2* and *RAP2.12* is similar in organ and tissue level, mainly expressing in the matured and germinating seeds, hypocotyl and leaf stem. Interestingly, ethylene treatment induces the expression of *RAP2.2* and *RAP2.3* genes but not the *RAP2.12*.

Our data show that the AP2/ERF transcription factors RAP2.2, RAP2.3 and *RAP2.12* are positive regulators of *ADH1* transcription, but probably act independently of ABA signal transduction.

11 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Papdi C, Ábrahám E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the Controlled cDNA Overexpression System. *Plant Physiol*, 147: 528–542.

Papdi C, Joseph MP, Pérez Salamó I, Vidal S, Szabados L (2009) Genetic technologies for the identification of plant genes controlling environmental stress responses. *Functional Plant Biology*, 36: 696-720

12 FÜGGELÉK

Az cDNS könyvtár készítésénél használt primerek:

SMART II A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
3' CDS primer II A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ N ₁ N-3'
	(N=A, C, G, T; N ₁ =A, G, C)
5' PCR primer II	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
ATTSM1:	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAC
	GCAGAGTACGCGGG-3'
ATTSM2:	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAC
	GCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTT-3'

Az adh1 promóter klónozásához és szekvenálásához használt primerek:

pADH-A	5'-ATTGGATCCTCATACTAACAGTCGTGGG-3'
pADH-B	5'-GAGAAGCTTTTGATCTTTTGTAGTTTGTG-3'
pADH-1	5'-CAACACCACGGCGTGACC-3'
pADH-2	5'-CTAGGTTACATGCTGCTATCGTACAGG-3'
pADH-3	5'-TGCTCTACCGCAAGGGATAGTACC-3'
pADH-4	5'-CGTACGTAGTGAGGTAGAGGCTTAGG-3'
LUC-rev	5'-GAAGTATTCCGCGTACGTGATGTTC-3'

Vektorspecifikus primerek:

DONR1	5'-TTAACGCTAGCATGGATCTCGG-3'
DONR2	5'-AACATCAGAGATTTTGAGACACGG-3'
ER8A	5'-GCTTGGGCTGCAGGTCGAGGCTAA-3'
ER8B	5'-CTGGTGTGTGGGCAATGAACTGATGC-3'
ER8C	5'-ATAAGGAAGTTTCATTTTGGAGAGGAC-3'
M13for	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

rt-PCR primerek:

ACTIN2F	5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'
ACTIN2R	5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'
ADHRTF	5'-AGCTGCTGTGGCATGGGA-3'
ADHRTR	5'-TCTGCGGTGGAGCAACCT-3'
GAPDH2-F	5'-AATGGAAAATTGACCGGAATGT-3'
GAPDH2-R	5'-CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA-3'
MYB2F	5'-GGCAATAGGTGGTCGAAGATTGCG-3'
MYB2R	5'-GTGTTTGGCTTGCTTTTGGACTCG-3'
MYC2F	5'-GATGAGGAGGTGACGGATACGGAA-3'
MYC2R	5'-CGCTTTACCAGCTAATCCCGCA-3'
RAP12A	5'-AAGATGCTGTAACGACTCAGGACAATGG-3'
RAP12B	5'-CTTCATCACAACTACCCTCAAGATAGA-3'
RD22F	5'-GCGATTGCGGCTGATTTAAC-3'
RD22R	5'-TGGAATGGGAGTGTGTTGGT-3'

RAP2.12 génspecifikus szekvenáló primerek:

RAP-Seq1	5'-GGATGGGGACGCTGAGAAATCTGC-3'
RAP-Seq2	5'-GGAGCGATCAAGCTCCGATAACTCC-3'
RAP-Seq3	5'-TGTTGTTGTAAGGTGTCTCGAAAT-3'

F1. táblázat. A munka során felhasznált oligonukleotidok listája

at1g16730	858	at2g30870	1002	at4g09120	1038
at1g16740	594	at2g31670	968	at4g09130	1074
at1g16750	1895	at2g31680	942	at4g23670	890
at1g16760	2277	at2g31690	1455	at4g23680	751
at1g16770	1264	at2g31700	396	at4g23690	877
at1g30200	1737	at2g31710	678	at4g23700	2732
at1g30210	1672	at3g06435	1164	at4g23710	697
at1g30220	1911	at3g06437	1469	at4g37280	1189
at1g30230	1049	at3g06440	2282	at4g37290	574
at1g30240	2723	at3g06450	2595	at4g37295	546
at1g52130	1452	at3g06455	1444	at4g37300	1049
at1g52140	891	at3g22940	1239	at4g37310	1892
at1g52150	3433	at3g22942	1125	at5g14060	2229
at1g52155	970	at3g22945	73	at5g14070	679
at1g52160	2889	at3g22950	915	at5g14080	2069
at1g71100	1040	at3g22955	469	at5g14090	1308
at1g71110	1987	at3g45840	1802	at5g14100	1316
at1g71120	1089	at3g45850	3379	at5g25850	1446
at1g71130	743	at3g45860	2031	at5g25860	1347
at1g71140	1543	at3g45870	1290	at5g25870	588
at2g06562	1022	at3g45880	1983	at5g25880	1884
at2g06570	834	at3g156170	1166	at5g25890	873
at2g06580	2991	at3g156180	857	at5g40010	1545
at2g06590	2099	at3g156190	1485	at5g40020	936
at2g06600	2952	at3g156200	1614	at5g40030	1500
at2g14520	1441	at3g156210	1494	at5g40040	562
at2g14530	1545	at4g02360	592	at5g40050	1248
at2g14535	1404	at4g02370	869	at5g51650	621
at2g14540	1499	at4g02380	694	at5g51660	4523
at2g14550	1759	at4g02390	2166	at5g51670	1425
at2g30830	1077	at4g02400	2726	at5g51680	1455
at2g30840	1256	at4g09090	491	at5g51690	3179
at2g30850	73	at4g09100	399		
at2g30860	971	at4g09110	909		

F2. táblázat. A TAIR adatbázisból random kiválasztott gének cDNS-einek mérete

A gének akcessziós száma mellett a prediktált transzkript hosszuk található bp-ban megadva. A 96 random kiválasztott gén egyenlő arányban származik az 5 kromoszómáról.

ADH1-LUC vonalak	biolumineszcencia növekedés ABS kezelés hatására (T1 generáció)	antibiotikum szelekció (T2 generáció)				
		kanamicin rezisztens	kanamicin szenzitív	összesen	szegregációs arány	inszertek száma
1	+	53	12	65	3:1	1
2	+	53	9	62	3:1	1
3	+	42	15	57	3:1	1
4	-					
5	+	47	12	59	3:1	1
6	+	59	3	62	15:1	2
7	+	61	2	63	15:1	2
8	+	41	19	60	3:1	1
9	+	50	15	65	3:1	1
10	-					
11	+	46	13	59	3:1	1
12	+	41	17	58	3:1	1
13	+	44	12	56	3:1	1
14	+	47	14	61	3:1	1
15	+	50	7	57	3:1	1
16	+	46	12	58	3:1	1
17	+	48	13	61	3:1	1
18	+	50	10	60	3:1	1
19	-					
20	-					

F3. táblázat. Az ADH1-LUC vonalak szelekciója

A bal oldalon a vonalak száma látható, a 2. oszlop mutatja azokat a T1 vonalakat melyekben detektálható volt a biolumineszcencia megváltozása ABS kezelését követően, a 3-7. oszlopban látható a T2 generáció kanamicin szelekciójának szegregációs arányai.

T2 vonalak	higromicin rezisztens	higromicin szenzitív	összesen	szegregációs arány	inszertek száma
ADH/39	44	14	58	3:1	1
ADH/83	45	10	55	3:1	1
ADH/102	38	12	50	3:1	1
ADH/109	44	15	49	3:1	1
ADH/121	47	7	54	3:1	1
ADH/150	52	3	55	15:1	2
ADH/161	45	14	59	3:1	1
ADH/242	62	3	65	15:1	2
ADH/255	40	16	65	3:1	1
ADH/259	48	5	53	3:1	1
ADH/272	40	21	61	3:1	1

F4 táblázat. cDNS könyvtárral transzformált ADH-LUC T2 vonalak higromicin szegregációs analízise

ABS 1:	csíranövények 10 μ M ABS kezelése, mintavétel: csíranövények, 1 és 3 óra;
ABS 2:	magokat 20 μ M ABS tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: magok, 24 óra;
ABS 3:	magokat 0,5 μ M ABS tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: magok, 48 óra;
ABS 4:	4 hetes növényeket 50 μ M ABS-val permeteztek, mintavétel: levelek, 4 óra;
ACC:	csíranövények 10 μ M ACC-vel kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
brassinolid:	csíranövények 10nM BL-dal kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
etilén:	virágzó növények 5 ppm etilén kezelése, mintavétel: virágok, 3 óra;
GA3:	csíranövények 1 μ M GA3 kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
IES 1:	csíranövények 1 μ M IES kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
IES 2:	7 napos csíranövények 5 μ M IES kezelése, mintavétel: csíranövények 2 óra;
MeJA:	csíranövények 10 μ M MeJA kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
szalicil sav:	csíranövények 10 μ M SA kezelése, mintavétel: csíranövények, 3 óra;
zeatin 1:	csíranövények 1 μ M zeatin kezelése, mintavétel: csíranövények, 1-3 óra;
zeatin 2:	növények 20 μ M zeatinnal permetezése, mintavétel: fiatal rozetta levelek, 1 óra;
hideg 1:	16 napos növényeket 4°C fokra tettek, mintavétel: egész növények, 0,5-3 óra;
hideg 2:	16 napos növényeket 4°C fokra tettek, mintavétel: egész növények: 6-24 óra;
szárazság stressz 1:	fiatal növények 15 perc légszárítás után, mintavétel: egész növények, 0,5-3 óra;
szárazság stressz 2:	fiatal növények 15 perc légszárítás után, mintavétel: egész növények, 6-24 óra;
hő stressz:	16 napos növény hőkezelése 38°C fokon, mintavétel: egész növények, 3 óra;
hipoxia 1:	csíranövények hipoxia kezelése (alacsony fényviszonyok), mintavétel: csíranövények, 12 óra;
hipoxia 2:	10 napos növényeket 1% O ₂ -t tartalmazó kamrába helyeztek, mintavétel: egész növény, 2 óra;
hipoxia 3:	10 napos növényeket 1% O ₂ -t tartalmazó kamrába helyeztek, mintavétel: egész növény, 48 óra;
ozmotikus stressz 1:	16 napos növényeket 300mM mannitol tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 1-3 óra;
ozmotikus stressz 2:	16 napos növényeket 300mM mannitol tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 6-24 óra;
só stressz 1:	16 napos növényeket 10mM NaCl tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 1-3 óra;
só stressz 2:	16 napos növényeket 10mM NaCl tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 6-24 óra;
oxidatív stressz 1:	16 napos növényeket 10 μ M metil-viologén tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 1-3 óra;
oxidatív stressz 2:	16 napos növényeket 10 μ M metil-viologén tartalmú táptalajra tettek, mintavétel: egész növény, 6-24 óra;
sebzés 1:	16 napos növények leveleit tűvel átszúrták, mintavétel: egész növény, 1-3 óra;
sebzés 2:	16 napos növények leveleit tűvel átszúrták, mintavétel: egész növény, 6-24 óra.

F5. táblázat. A Genevestigator adatbázisból kiválasztott hormon és stressz kezelések, és a mintavételek körülményei, a *RAP2.2*, *RAP2.3*, *RAP2.12* transzkriptek viszonyított mennyiségének meghatározásakor.