



Doktori értekezés tézisei



**A foszfátéhezés, mint a stresszindukált prolinszintézis kiváltója  
*Arabidopsis thaliana*-ban**

**Aleksza Dávid**

Témavezetők:

Dr. Szabados László-tudományos tanácsadó  
Dr. Horváth V. Gábor-tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia-Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet

**Szeged**

## Bevezetés

A növények, helyhez kötött életmódjuknak köszönhetően ki vannak szolgáltatva a környezeti változásoknak, melyek akár hátrányosan is befolyásolhatják növekedésüket, fejlődésüket, és szaporodásukat. Ezekre a stresszfolyamatokra válaszul a növények számtalan jelátviteli-, és anyagcsereutat fejlesztettek ki, ezeket komplex szabályozó utak irányítják és segítségével mérsékelni tudják károsodásukat. A stresszindukált metabolitok közül az egyik legfontosabb a szabad prolin. Számos tanulmányban kimutatták, hogy felhalmozódik só-, szárazságstressz, nehézfémek, és egyes patogének indukálják felhalmozódását, nem születt azonban tanulmány a prolinnak tápanyaghiány esetén játszott szerepével kapcsolatban. A növényi védekezésben betöltött szerepe sokrétű lehet: hathat ozmoprotektánsként, szerepet játszhat enzimek és sejtstuktúrák stabilizálásában, reaktív oxigén formák kioltásában és a redox egyensúly fenntartásában. Ezeken felül a prolin fontos szerepet játszik a növény fejlődésének szabályozásában, a virágzásban, az embrió és a levél kialakulásában is. A prolin mennyiségét a bioszintézis és a lebontás közötti egyensúly határozza meg. A bioszintézis a glutaminsav útvonalon keresztül zajlik, és kulcsenzime a pirrolin-5-karboxilát szintáz (P5CS). Ennek Arabidopsisban két izoformája ismert, a jellemzően háztartási génként működő *P5CS2* és a stresszindukált *P5CS1*. A *P5CS1* indukciója fényfüggő valamint reagál ROS (Reaktív Oxigén Formák)-szignálokra, hiperozmotikus stresszre tovább szabályozás történhet abszcizinsav függő és független módon is. A *P5CS2* ugyanakkor gazda-patogén kölcsönhatás illetve hiperszenzitív válaszreakciók során indukálódhat. Az abszcizinsav mellett számos transzkripció faktor is hatással lehet a gén kifejeződésére, ugyanis promoterén megtaláljuk BZIP, MYB, MYC, AP2/EREBP és C2H2 Cink-ujj típusú transzkripció faktorok kötőhelyét is.

A foszfor a biomolekulák alapvető építőeleme. Megtaláljuk foszfolipidekben, nukleinsavakban, ATP-ben valamint fontos szerepet játszik a fehérjemódosításokban is. Az oldott szervetlen foszfát számos esetben kis mennyiségben található meg a talajban, mivel ez az elem gyakran különböző fémekkel oldhatatlan komplexet képez, vagy a

talajmikrobák által szerves vegyületekben fixálódik, melyeket a növények nem képesek asszimilálni. Napjainkban a foszfáthiány a megművelt földterületek 70%-át érinti és komoly termés kiesést eredményez, továbbá a műtrágyák használatát a modern mezőgazdaság nélkülözhetetlen elemévé teszi. A foszfáthiány összetett stresszt jelent a növények számára: gátolja a hajtás és a főgyökér növekedését, ugyanakkor serkenti az oldalgyökerek fejlődését és a gyökérszőrök kialakulását melyek elősegítik a foszfát elérését. A foszfáthomeosztázis összetett jelátvitel hálózatot igényel, melynek tagjai összehangolják a felvételt, szállítást és anyagcserét is. Transzkripciós vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a foszfátéhezés esetén fellépő szabályozó rendszer, az ún. phospho-regulon kulcsfontosságú elemei a PHR1 (phosphate starvation 1) és a PHL1 (phosphate starvation 1-like) transzkripciós faktorok. Ezek a MYB-típusú fehérjék a célgénjeik promoteréhez kötve szabályozzák azok kifejeződését ezáltal olyan anyagcsere és fejlődési útvonalakat, melyek esszenciálisak a növények számára a foszfátéhezés elkerüléséhez, illetve annak káros hatásainak kivédéséhez.

### **Célkitűzések:**

- 1, Élesztő egy-hibrid rendszerrel lehetséges *P5CS1* promóter kölcsönható partnereket kutatunk fel, majd a kölcsönhatást független módszerekkel igazoljuk;
- 2, A kölcsönható transzkripciós faktor ismeretében vizsgáljuk a vad típusú *Arabidopsis*ban végbemenő növekedésbeli és metabolikus változásokat;
- 3, Felderítjük az emögött álló molekuláris mechanizmusokat és kölcsönhatásokat;
- 4, Amennyiben lehetséges, mutáns vonalakon teszteljük a *P5CS1* és a jelölt kölcsönható kapcsolatát;
- 5, Az újonnan azonosított kölcsönható partnerrel bővítjük a *P5CS1* stresszben betöltött szerepével kapcsolatos ismereteinket.

## **Anyagok és módszerek:**

### Növényi anyag:

- kísérleteinkben a kontroll: a Columbia-0 (vad típus) volt
- prolin metabolizmus mutánsok: *p5cs1-1*, *pdh1-4*, *pdh2-2*
- foszfátéhezési mutánsok: *phr1*, *phl1*, *phr1phl1*
- abszcizinsav bioszintézis és jelátviteli mutánsok: *aba2-3*, *abi4-1*, *abi5-1*

### Módszerek:

- DNS és RNS izolálás
- végpont és valós idejű PCR
- élesztő és bakteriális klónozás
- fehérje izolálás
- élesztő egy-hibrid rendszer
- Electrophoretic Mobility Shift Assay
- kromatin-immunoprecipitáció
- poliakrilamid gélelektroforézis
- western blot
- prolintartalom, klorofilltartalom, hydrogen-peroxid és lipid-peroxidációs mérések
- fluoreszcens mikroszkópia

## **Eredmények és értékelésük**

Élesztő egy-hibrid kísérletben kölcsönható parterként többek között a foszfátéhezés kulcsregulátora(i)ként ismert *PHR1* (Phosphate Starvation Response-1) és *PHL1* (Phosphate Starvation Response-1 Like) transzkripció faktorokat is eredményül kaptam. A foszfátéhezéskor betöltött szerepük mellett ezekről a transzkripció faktorokról ismert, hogy szerepet játszanak a kén, a vas és a cink transzportjának szabályozásában is. A *PHL1* indukcióját kimutatták só-, és ozmotikus stressz következtében is, valamint a *PHR1* és a *PHL1* is szabályozódhat az ABA jelátviteli úton keresztül, és a *P5CS1*-hez hasonlóan a fény szintén meghatározó szerepet játszik

aktiválódásukban. Dolgozatomban Electromobility Shift Assay (EMSA) és Kromatin Immunoprecipitáció ChIP kísérletekkel bizonyítottam az élesztő egy hibrid rendszer eredményeit. megállapítottam, hogy az *E. coli*-ban termeltetett PHR1 és PHL1 fehérjék koncentráció függően, szelektíven képesek kötődni a P1BS helyet tartalmazó *P5CS1* promóter fragmenthez. A ChIP kísérletben HA-epitóp taggelt PHR1-et expresszáló növényekben kimutattam, hogy a P1BS-t tartalmazó promóter fragment az immunoprecipitációt követő polimeráz láncreakció során feldúsul a kötőhelyet nem tartalmazó fragmentekhez képest.

Tanulmányoztam a foszfátéhezés tüneteit vad típusú és mutáns *Arabidopsis* vonalakban is, mind élettani, mind molekuláris biológia szempontokból. A növényeket 2,5 mM foszfátot tartalmazó táptalajon csíráztattuk, majd 14 napra foszfátmentes, 2,5- foszfátot tartalmazó (kontroll), illetve 10mM foszfátot tartalmazó táptalajra helyeztük. Megfigyeltük, hogy 4 nap után a szabad prolin szint emelkedni kezdett és a 14 nap leteltével a kontroll érték négyszeresét mutatta. A 10mM foszfátot tartalmazótáptalajon a kontrollal megegyező mennyiségű prolin akkumulációját detektálhattuk. Emögött génextpressziós szinten a *P5CS1* 3-5-szörös valamint a *PDH2* 4-6-szoros indukciója áll, mely egy felgyorsult prolin körfogást feltételez. A további prolinmetabolizmusban részt vevő gének (*P5CS2*, *P5CR*, *P5CDH*, *PDH1*) kifejeződése nem vagy alig változott a foszfátéhezés alatt. A vad típus esetében talákoztunk az irodalomból már jól ismert foszfátéhezés kori élettani reakciókkal, mint a főgyökér növekedésének gátlása, a megnövekedett oldalgyökér-képződés, a hajtás növekedésének gátlása és az antocián felhalmozódás. A gyökérben *p5cs1-gfp* konstrukció segítségével nyomon követtük az enzim mennyiségi és térbeli változását is, és azt tapasztaltuk, hogy míg kontroll körülmények között egyedül a főgyökér csúcsából sikerült detektálni GFP jelet, addig az éheztetett növényben a főgyökér csúcsában a jel elhalványul, és az oldalgyökerek eredésénél, valamint azok gyökércsúcsában válik kifejezetté. A foszfátéhezéssel járó károsodásokra utal a növényekben mért megemelkedett lipid-peroxidáció valamint  $H_2O_2$  szint is. Megvizsgáltuk a *phr1*, *phl1* és *phr1phl1* mutánsokban is a foszfátéhezés tüneteit. Kontrol körülmények között a Columbiához hasonlóan növekedtek, de foszfátéhezés hatására a szimpla mutáns *phr1* és különösen a dupla *phr1phl1* mutáns szignifikánsan visszamaradtak a növekedésben, és mindhárom mutánsban

megfigyelhető volt a levelek fakulása is, amivel a vad típusban egyáltalán nem találkoztunk. A prolin termelődést is vizsgáltuk ezekben a mutáns növényekben foszfátéheztetés alatt, és ennek szintje 50%-kal elmaradt a vad típushoz képest. Ez azt mutatja, hogy amikor a foszfátéheztetés kulcsregulátorai hiányoznak, akkor a prolin szintézis is károsodik. A só-, és, abszcizinsav kezelés egyformán serkenti a prolinakkumulációt *phr1*, *phl1* és Col0 vonalakban is, azonban a *phr1phl1* esetben jelentősen kevésbé. Eredményeink azt mutatják, hogy a PHR1 és PHL1 transzkripció faktorok fontosak a prolin szintézisben foszfátéheztetés, és kisebb mértékben sóstressz és ABA-kezelés esetén is. A prolinakkumuláció eredményeivel egybevágnak génexpressziós megfigyeléseink is, melyekben ezek a mutánsok alig mutattak P5CS1 indukciót, azonban a PDH2 indukciója hajtásban magasabb, míg gyökérben jóval alacsonyabb volt, mint a vad típusban, ez pedig magyarázatot jelent az alacsonyabb mértékű prolinakkumulációra.

Mivel mind a stresszindukált prolin szintézis, mind a foszfátéheztetés működhet abszcizinsav-függő útvonalon, ebben az irányban is végeztünk kísérleteket. Az ABA-szintézisében gátolt *aba2-3* mutáns növényekben hajtását vizsgálva foszfátéheztetés alatt csak minimális növekedésgátlást tapasztaltunk a kontrollhoz képest, ugyanakkor erre a vonalra volt a leginkább jellemző a levelek fakulása. Ebben a vonalban az akkumulálódott szabad prolin szintje csak minimálisan emelkedett meg a nem foszfátéheztetett kontrollhoz képest. A Columbiához képest az *aba2-3* és az *abi4-1* vonalakban csak fele akkora P5CS1 génexpresszió változást tudtunk regisztrálni, ugyanakkor a PDH2 expressziós értékeiben nem találtunk jelentős változást, vagyis a csökkent génexpressziós aktivitás a bioszintézis oldalról, párosítva a lebontásért felelős gén változatlan indukciójával magyarázatot szolgáltat a csökkent prolinakkumulációra. A szintén ABA jelátviteli mutáns *abi5-1* a vad típushoz hasonló értékeket mutatott mind prolinakkumulációban, mind génexpressziós szinten. Azt, hogy a foszfátéheztetésre bekövetkező szabad prolin szintézisben legalább részben az ABA-jelátviteli út is szerepet játszik az is igazolja, hogy éhezéskor az abszcizinsav bioszintézis kulcsgénjének az *NCED3*-nak a háromszoros indukcióját tapasztaltuk a kontrollhoz képest. Eredményeink azt mutatják, hogy foszfátéheztetés alatt a prolinakkumuláció legalább részben abszcizinsav függő jelátviteli utakon keresztül zajlik. Valós idejű PCR-

rel igazoltuk továbbá, azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint a PHR és PHL1 transzkripciós faktorok expressziója nem változik a foszfátéhezés során, illetve azt is, hogy a növények foszfátéhezésre mutatott fenotípusa elképzelhető, hogy valamilyen szinten kapcsolatban állhat a szenescencia folyamatával. A prolinmetabolizmus szerepét foszfátstressz alatt a prolin bioszintézisében illetve lebontásában mutáns *p5cs1-1*, *pdh1-4* és *pdh2-2* vonalakon teszteltük. A *p5cs1-1* mutánsban egyáltalán nem történt prolin felhalmozódás a foszfátéhezés során, így kijelenthetjük, hogy ebben az esetben is ez a gén kódolja a prolinszintézis kulcsenzimét. A *pdh1-4* mutánsban a vad típusnak megfelelő mennyiségű prolin termelődött a foszfátéhezés alatt, míg a *pdh2-2* mutánsban annál 30%-kal több. A mutánsok hatásának növekedése megfelel a vad típusnak kontroll és foszfáthiány esetén egyaránt, míg a gyökérnövekedést tekintve a *p5cs1-1* főgyökere kis mértékben, bár de szignifikánsan rövidebbnek bizonyult, mint a vad típusé. A táptalajhoz adott prolin (1mM ill 10mM) gátolta a rozetták növekedését a vad típusban és a *phr1phl1* mutánsban is foszfáttartalmú táptalajon. Foszfát hiányában a *phr1phl1* kisebbnek bizonyult a vad típusnál és a növekedését a táptalajhoz adott prolin nem befolyásolta szignifikánsan. Összességében a megemelkedett intenzitású prolinszintézis szükséges a gyökérnövekedés fenntartásához foszfátéhezés alatt, ugyanakkor nincs hatással a rozetták növekedésére.. Kísérleti rendszerünkben a hozzáadott prolin nem segítette a növényekben a foszfátéhezés okozta károsodások enyhítésében.

## Összefoglalás

Vizsgálataink kimutatták, hogy *Arabidopsis thaliana* növényekben a foszfátéhezés prolinakkumulációt idézett elő. A PHR1 és PHL1 transzkripciós faktorokat egyaránt azonosítani tudtuk élesztő 1-hibrid rendszerben a *P5CS1*- a stresszindukált prolin szintézis kulcsgénjének-kölcsönható partnereként valamint megtaláltuk ezek kötőhelyét a gén első intronjában. Az említett transzkripciós faktorok kötődését *in vitro* EMSA és *in vivo* CHIP kísérletekben igazoltuk. Foszfátéheztetett növényekben a megnövekedett prolinakkumulációt a prolin szintézis kulcsenzimét kódoló génnek, a *P5CS1*-nek megnövekedett expressziója okozza. A foszfátéhezés *P5CS1* mellett a prolin lebontásáért felelős *PDH2* gén kifejeződésére is serkentőleg hat. A *P5CS1* és a *PDH2* expressziójának emelkedése egy felgyorsult prolin körforgás kialakulását feltételezi foszfátéhezés esetén. Eredményeink alapján a prolin bioszintézis a már részletesen tanulmányozott dehidratáció mellett, foszfáthiány fellépte esetén is abszcizinsav függő szignálok által szabályozódik.

## Köszönetnyilvánítás

A munka finanszírozásához az OTKA-NN110962, OTKA-K7623, OTKA-K109719, GINOP 2.3.2-15-2016-00001, és NTP-EFÖ-P-15-0157 pályázatok járultak hozzá.



## **A doktori eljárás alapjául szolgáló közlemények:**

**Aleksza D**, Horváth GV, Sándor G, Szabados L. Proline accumulation is regulated by transcription factors associated with phosphate starvation. *Plant Physiol.* 2017 Sep;175(1):555-567. doi: 10.1104/pp.17.00791. Epub 2017 Aug 1. IF:6,456

Olah Z, Bush AI, **Aleksza D**, Galik B, Ivitz E, Macsai L, Janka Z, Karman Z, Kalman J, Datki Z. Novel in vivo experimental viability assays with high sensitivity and throughput using a bdelloid rotifer. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017 Oct;144:115-122. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.005. Epub 2017 Jun 9. IF:3,743

**MTMT azonosító: 10060588**

## **További publikációk.**

### Konferencia előadás:

**Aleksza D**, Kovács H, Szabados L, Horváth GV: Regulation of protective proline synthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Advances in plant breeding & biotechnology techniques 27–29 April, 2014 Mosonmagyaróvár, Hungary*

### Poszterek:

Nagy, Z., **Aleksza, D.** and Pécsváradi, A.: Aluminium activates the chloroplastic glutamine synthetase in wheat. *ISIRR 2010. 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research. Szeged, Hungary. 13-15. October 2010. SB-21, p.: 9.*

**Aleksza D.**, Turóczy Z, Szabados L and Horváth GV: Enzyme deactivation by reactive carbonyls: in vitro protection by proline 2012. *MTA SZBK Straub-napok*

**Aleksza D.**, Kovács H, Szabados L and Horváth GV: Identification of AtP5CS1 promoter binding transcription factors by yeast one-hybrid system (2015.) *MTA-SZBK Straub-days*

**Aleksza D**, Kovács H, Szabados L and Horváth GV. Connection of phosphate starvation response regulation and proline metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Signalling in plant development. 20 – 24 September 2015. Brno*

**Aleksza D**, Kovács H, Horváth GV and Szabados L. Connection of phosphate starvation response regulation and proline metabolism in *Arabidopsis thaliana* FESPB Congress 2016. June 26-30 Prague

## Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője és első szerzője nyilatkozom, hogy Aleksza Dávid jelentősen hozzájárult a tudományos közlemény eredményeinek létrehozásához (DNS mintaizolálás és PCR vizsgálatok optimalizációja, szekvenálás előkészítése).

A jelölt a publikációban foglalt eredményeket semmilyen formában nem használta fel doktori tézisének elkészítése során.

Olah Z, Bush AI, **Aleksza D**, Galik B, Ivitz E, Macsai L, Janka Z, Karman Z, Kalman J, Datki Z. Novel in vivo experimental viability assays with high sensitivity and throughput using a bdelloid rotifer. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017 Oct;144:115-122. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.005. Epub 2017 Jun 9.

Impakt faktor: 3.743

.....  
Dr. Datki Zsolt  
felelős szerző

.....  
Oláh Zita  
első szerző