

Doktori (PhD) értekezés

**AZ UV-B JELÁTVITEL MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATA  
*ARABIDOPSIS THALIANABAN*: AZ ANAC13 TRANSZKRIPCIÓS  
FAKTOR SZEREPÉNEK JELLEMZÉSE**

**Sáfrány Judit**



**Budapest**

**2011**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**vezet je:** Dr. Tóth Magdolna  
egyetemi tanár, DSc  
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcssterm Növények Tanszék

**Témavezet :** Dr. Bisztray György Dénes  
egyetemi docens, PhD  
Budapesti Corvinus Egyetem, Sz lészeti és Borászati Intézet,  
Sz lészeti Tanszék

**Küls konzulens:** Dr. Dallmann Géza  
biológiai tudományok kandidátusa, tudományos f munkatárs  
Mez gazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontot, Gödöll  
Búza Genetika Csoport

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában el írt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés m helyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

í í í í í í í í í í í .  
Az iskolavezet jóváhagyása

í í í í í í í í í í ..  
A témavezet jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2011. március 8-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Pedryc Andrzej, DSc

**Tagjai**

Stiller Ibolya, PhD

Dóczi Róbert, PhD

Papp István, PhD

**Opponensek**

Janda Tibor, CSc

Jenes Barnabás, CSc

**Titkár**

Hegedűs Attila, PhD

# TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	8
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKIT ZÉS .....	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
2.1. Fényérzékelés és jelátvitel .....	13
2.1.1. A fotoreceptorok.....	13
2.1.1.1. A fitokrómok .....	13
2.1.1.2. A kriptokrómok.....	14
2.1.1.3. A fototropinok .....	15
2.1.2. Fotoreceptor által közvetített fényválaszok .....	15
2.1.3. Fény által indukált komplex jelátviteli utak és transzkripcionális hálózatok .....	16
2.2. Az UV-B sugárzás hatása a növények növekedésére és fejl désére.....	18
2.2.1. Az UV-B által okozott DNS-károsodás és javítás.....	19
2.2.1.1. A fotoreaktiváció .....	20
2.2.1.2. Az excíziós repair mechanizmus .....	21
2.2.1.3. Rekombinációs repair.....	22
2.2.2. Nem károsító, fotomorfogénikus UV-B válaszok és UV-B érzékelés .....	22
2.2.3. Az UV-B jelátvitel lehetséges közvetít i.....	25
2.2.3.1. Reaktív oxigénformák.....	26
2.2.3.2. Hormonok.....	26
2.2.3.3. Kalcium .....	26
2.2.3.4. Foszforiláció .....	27
2.2.3.5. Nitrogén-monoxid.....	27
2.2.4. Az UV-B jelátvitel ismert, genetikailag meghatározott elemei .....	28
2.2.4.1. Az UV-B válaszok negatív szabályozó elemei.....	28
2.2.4.2. Az UV-B válaszok pozitív szabályozói .....	29

2.3. NAC transzkripció faktorok .....	31
2.4. Fényszabályozó elemek .....	34
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	35
3.1. Felhasznált anyagok .....	35
3.1.1. Vegyszerek és enzimek .....	35
3.1.2. Baktériumtörzsek .....	35
3.1.3. Plazmidok és klónok .....	35
3.1.4. Táptalajok .....	35
3.1.5. Növényi anyag és nevelési kondíciók .....	36
3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> transzformáció, transzgénikus növények előállítása .....	37
3.3. Abiotikus és biotikus stresszkezelések körülményei, és a luciferáz-aktivitás mérése	38
3.4. Molekuláris biológiai módszerek .....	39
3.4.1. Plazmid DNS tisztítása .....	39
3.4.2. Növényi DNS tisztítása .....	39
3.4.3. Southern-analízis .....	39
3.4.4. Növényi RNS tisztítása .....	40
3.4.5. RNS-analízis .....	40
3.4.6. Polimeráz láncreakció, PCR termékek klónozása, szekvenálása .....	40
3.4.7. Inverz PCR .....	41
3.4.8. RT-PCR .....	41
3.4.9. Irányított pontmutáció létrehozása .....	42
3.4.10. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> konjugáció .....	43
3.4.11. EMS mutagenézis .....	43
4. EREDMÉNYEK .....	44
4.1. Az UV-B által indukált transzkripcionális változások vizsgálata .....	44
4.1.1. Magas UV-B indukciót mutató gének expressziós mintázata .....	44
4.1.2. Az ANAC13 gén korai UV-B válaszána spektrális függése .....	48
4.1.3. Az ANAC13 gén UV-B indukciója gyors és tranzien .....	49
4.1.4. Az ANAC13 transzkripcionális szint UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól .....	49
4.1.5. Az ANAC13 UV-B jelátvitelben elfoglalt pozíciója .....	50

4.2. A Pro <sup>ANAC13</sup> ::Luc riporter konstrukció jellemzése .....	52
4.2.1. A transzgén beépülésének meghatározása .....	52
4.2.2. A transzgén kifejezésének szövetspecifikussága az ANAC13#14 inszerciós vonalban .....	54
4.3. Az ANAC13 fényválasza.....	54
4.3.1. Az ANAC 13 aktiválódik vörös fény kezelésre .....	54
4.3.2. Az ANAC13 UV-B és vörös fény válasza részben különböző cisz-elemek részvételével szabályozott.....	55
4.4. Feltételezett UVBox azonosítása és jellemzése .....	58
4.4.1. Pontmutánsok azonosítása luciferáz alapú genetikai szérő során.....	58
4.4.2. Az azonosított UVBox <sup>ANAC13</sup> szabályozó elem UV-B specifikus indukálhatóságot kölcsönöz a CaMV35S minimál promóternek.....	61
4.4.3. Az UVBox <sup>ANAC13</sup> promóter elem szerepe más jelátviteli utakban .....	63
4.4.4. Az UVBox <sup>ANAC13</sup> promóter elem hullámhossz és intenzitás függése .....	64
4.5. Új tudományos eredmények.....	66
5.1. Az UV-B által indukált transzkripcionális változások vizsgálata.....	67
5.1.1. Magas UV-B indukciót mutató gének expressziós mintázata.....	67
5.1.2. Az ANAC13 gén korai UV-B válaszáinak spektrális függése.....	68
5.1.3. Az ANAC13 transzkripcionális szint UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól.....	69
5.1.4. Az ANAC13 UV-B jelátvitelben elfoglalt pozíciója .....	70
5.2. Az ANAC13 fényválasza.....	71
5.2.1. Az ANAC13 aktiválódik vörös fény kezelésre .....	71
5.2.2. Az ANAC13 UV-B és vörös fény válasza részben különböző cisz-elemek részvételével szabályozott.....	72
5.3. Feltételezett UVBox azonosítása és jellemzése .....	73
5.3.1. Pontmutánsok azonosítása luciferáz alapú genetikai szérő során.....	73
5.3.2. Az azonosított UVBox <sup>ANAC13</sup> specifikus cisz-szabályozó elemként működik az UV-B válaszban.....	75
ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
SUMMARY.....	79
MELLÉKLETEK.....	81

M1. Irodalomjegyzék .....	81
M2. Táblázatok .....	93
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	96

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

35S	CaMV 35S RNS gén promótere
ABA	abszcizinsav
ACE	ACGT-t tartalmazó elem
ANAC13	<i>Arabidopsis</i> NAC domain transzkripció faktort kódoló gén
bHLH	basic helix-loop-helix motívum
bp	bázis pár
bZIP	basic leucine-zipper motívum
CaMV	karfiol mozaik vírus
CCD	charge-coupled device
CDPK6	calcium-dependent protein kinase 6
CFI	kalkon-flavanon-izomeráz
CHS	kalkon-szintáz
Col	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ökotípus
COP1	constitutive photomorphogenic 1
Cry1/2/3	kriptokróm 1/2/3 (holoproteinek)
CUC2/3	cup-shaped cotyledon 2/3
DREB2A	drought responsive element-binding protein 2A
ELIP2	early light induced protein 2
EMS	etil-metán-szulfonát
F3H	flavanon-3-hidroxiláz
FAR1	far-red impaired response 1
FHY3	long hypocotil in far-red light 3
FLS	flavanol szintáz
HY5	elongated hypocotil 5



HYH	HY5-homolog
IPTG	izopropil-tio- -D-galaktozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LB	baloldali határoló szekvencia
Ler	<i>Arabidopsis thaliana Landsberg erecta</i> ökotípus
LRU/LRE	fényszabályozó unit/elem
Luc	luciferáz riporter gén
MKP1	MAP-kináz-foszfatáz 1
MRE	MYB-felismer elem
NAM	no apical meristeme
NER	nukleotid excíziós repair
PHR	photolyase-related
Phot1/2	fototropin 1/2 (holoproteinek)
PhyA/B/C/D/E	fitokróm A/B/C/D/E (holoproteinek)
Pro	promóter
RB	jobboldali határoló szekvencia
ROS	reaktív oxigén fajták
RT-PCR	reverz transzkripció-PCR
ULI3	UV-B light insensitive 3
UV-A/B/C	ultraviola (ultraibolya)-A/B/C
UVR8	UV-resistance locus 8
WL	fehér fény
Ws	<i>Arabidopsis thaliana Wassilewskija</i> ökotípus
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- -D-galaktopiranozid
ZAT12	a zinc finger protein 12

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKIT ZÉS

Földünk nélkülözhetetlen energiaforrása a fény. A Napból érkező fénysugárzás alapvető energiát nyújt szinte az összes élő szervezet számára, bár közülük csak a növények és néhány baktériumfaj képes közvetlenül elnyelni, és biológiailag felhasználható kémiai energiává alakítani. A fény azonban nem csak energiaforrás, amely a fotoszintézist irányítja, hanem mint az érzékelés legfontosabb közege, környezetünkről alapvető információkat hordoz, továbbá a különböző életfolyamatok szabályozásának is az egyik legfontosabb eszköze. A növények optimális teljesítőképességének nélkülözhetetlen feltétele, hogy képesek legyenek az állandóan változó környezeti tényezőkre, köztük a fényminőségre, fény mennyiségre, a megvilágítás időtartamának állandó változásait pontosan érzékelni, és arra válaszolni. Erre a célra a növények egy kifinomult fényérzékelő rendszert fejlesztettek ki, amely folyamatosan ellenőrzi a környezet fényviszonyait. A fitokrómok a fény spektrumának vörös és távoli vörös, míg a kriptokrómok és fototropinok a kék és UV-A régiók érzékelésére specializálódtak. Ezen fotoreceptorok által érzékelt fény továbbítódik egy komplex szignál transzdukciós kaskád felé, és jelátviteli utakon keresztül nagyszámú morfológiai és fiziológiai választ irányít a növények teljes életciklusa folyamán.

A Föld felszínét elérő UV-B (Ultraviola-B/Ultraviolet-B) sugárzás a Nap elektromágneses sugárzásának egyik lényeges része. A növényeknek fényfüggő életmódjuk és helyhez kötött életformájuk következtében elkerülhetetlenül számolniuk kell az érkező UV-B sugárzással. A nagy intenzitású UV sugárzás különböző stresszválaszokat válthat ki, mint pl.: oxidatív stresszt okoz, károsítja a sejtalkotók lipid és proteinkomponenseit, a legfontosabb viszont a DNS- és RNS-károsító hatása. Az UV-B azonban nem csak egyszerű stresszfaktor. Hasonlóan a fény spektrum más régióihoz, a kis intenzitású UV-B mint környezeti jel, alapvető információhordozó. Számos tény utal egy specifikus UV-B érzékelő rendszer jelenlétére, amely elkülöníthető a károsító folyamatoktól és a már ismert, látható fény érzékelésében résztvevő fotoreceptoroktól is.

Szemben a látható fény és az UV-A sugárzás érzékelésével és jelátvitelével, a nem károsító hatású UV-B-specifikus válaszok közvetítésében résztvevő elemek még nagyrészt ismeretlenek, illetve az érzékelésben résztvevő fotoreceptor molekuláris azonosítása is hátra van.

Munkánk célja az UV-B érzékelés és jelátvitel alapjául szolgáló molekuláris mechanizmusok feltárása, kezdve az UV-B sugárzás által kiváltott specifikus transzkripcionális szintű változások felmérésével. A kapott eredmények után további alapot nyújthat az UV-B

válasz lehetséges, új komponenseinek feltárásához, és az UV-B és látható fény által irányított jelátviteli folyamatok összehasonlításához.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Minden él lény életének lényeges feltétele, hogy képesek legyenek pontosan érzékelni környezetük jeleit, illetve gyorsan válaszolni azokra. A növények és számos baktérium számára a fény a legfontosabb környezeti elem. Ezek azok az él szervezetek, amelyek képesek a napfényt közvetlenül elnyelni, és biológiailag felhasználható kémiai energiává alakítani. A növények egy kifinomult fényérzékelő rendszert alkalmaznak, amellyel folyamatosan követhetik környezetük változó fényjeleit, és amely segíti megfelelő válaszreakcióikat. A növények fényérzékelési mechanizmusainak molekuláris szinten való leírásában eddig háromféle fotoreceptor családot jegyeztek le, a vörös és távoli-vörös fény érzékelésében a fitokrómok, míg a kék és UV-A sugárzás érzékelésében a kriptokrómok és fototropinok vesznek részt (Chen és mtsai., 2004). A spektrum ezen régióinak érzékelése és szignál transzdukciója kulcsfontosságú szerepet játszik számos fiziológiai válaszban a növények teljes életciklusa folyamán, többek között a csírázás, a fotomorfogenezis, a foto- és gravitropizmus, a cirkadián ritmus és a virágzásindukció folyamatában (Jiao és mtsai., 2007).

A fény jelentőségét leginkább a csíranövények kezdeti fejlődési fázisában, még hozzá a csírázás és az első igazi levelek megjelenése közötti időszakban lehet jól szemléltetni. Ezt a folyamatot, melynek során az endospermiumból táplálkozó embrió önálló, fotoautotróf növényé fejlődik, fotomorfogenezisnek nevezzük (Nemhauser és Chory, 2002). Abban az esetben, amikor a fény csak korlátozottan, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, a csíranövények etiolált fejlődést mutatnak, melyet a pigmentáció hiánya, a fejletlen és szorosan összezáródott sziklevekben végződő megnyúlt hipokotil, és fejletlen gyökérzet jellemez. Ezt a folyamatot skotomorfogenezisnek nevezzük. Az ilyen típusú növekedés biztosítja a csíranövény számára, hogy a mag endospermiumában tárolt tápanyagok felhasználásával a talajból kiemelkedve fényre jusson. A fény megjelenésével vált át a növény fejlődési programja skotomorfogenezisből fotomorfogenezisbe, amelyet deetiolációnak is nevezünk. Ennek során a hipokotil elongáció abbamarad, szétnyílnak, megnövekednek és kiszövellnek a sziklevek, valamint fejlődésnek indul a gyökérzet is. Az ilyen alapvető változások a környezeti jelek, köztük a fény kifinomult érzékelését és értelmezését igénylik, nem csak csíranövény korban, hanem a növény teljes élete során.

A bioszférába belépő napsugárzás a látható fényen kívül számottevő UV-B sugárzást is tartalmaz. Abszolút fényfüggő életmódjuk és helyhez kötött életformájukból adódóan, a növényeknek elkerülhetetlenül számolniuk kell a spektrum ezen régiójával is. Az UV-B sugárzás

él sejtekben okozott károsító hatásai, mint pl. szinte az összes f<sub>2</sub> biomolekula, köztük a DNS károsítása, jól ismertek (Ulm és Nagy, 2005). Az UV-B azonban nem csak egyszerű stresszfaktor, hanem hasonlóan a spektrum látható fény és UV-A régióhoz, mint környezeti jel, meghatározó információk hordozója (Paul és Gwynn-Jones, 2003). Szemben a látható fény és az UV-A sugárzás érzékelésével és jelátviteli folyamatával, az UV-B-specifikus válaszok közvetítésében résztvevő elemekről jóval kevesebb ismeretanyag áll rendelkezésünkre, és az érzékelésben résztvevő fotoreceptor molekuláris azonosítása is hátra van még.

## **2.1. Fényérzékelés és jelátvitel**

A növények számára a fény a biológiai energia alapvető forrása. Helyhez kötött és fotoautotróf életmódjukból adódóan különösen érzékenyek ezen nélkülözhetetlen környezeti elem változásaira. Ebből adódóan számos kifinomult fényérzékelő rendszert alkalmaznak, melyek detektálják a beeső fénysugárzás időtartamát, irányát, intenzitását és színét (hullámhossz). Négy fotoreceptor család kíséri figyelemmel a teljes fényspektrumot: a távoli vörös/vörös régiót érzékelő fitokrómok, a kék/UV-A-t érzékelő kriptokrómok és fototropinok, illetve a még ismertetlen természetű UV-B érzékelő fotoreceptorok (Nagy és Schaffer, 2002; Quail, 2002a; Wang és Deng, 2002; Gyula és mtsai., 2003; Chen és mtsai., 2004; Ulm, 2006).

### **2.1.1. A fotoreceptorok**

#### **2.1.1.1. A fitokrómok**

A fitokrómok két ~ 125 kDa méretű polipeptidből álló dimer fehérjék, melyekhez egy lineáris tetrapirrol kromofor (fitokromobilin) kapcsolódik kovalensen. A fehérje két funkcionális domainből áll: egy N-terminális fényérzékelő, illetve egy C-terminális szabályozó domainből. Az N-terminális domain bilin-liáz szubdomain-jének egy konzervált ciszteinjén keresztül kapcsolódik a fitokromobilin A gyűrűjéhez.

A fitokrómok főként a vörös/távoli vörös fényt abszorbeálják, de a spektrum kék régiójában is mutatnak kismértékű elnyelést (Wang és Deng, 2002). A fitokrómok fényérzékelési sajátosságai abban rejlenek, hogy két, fényindukált, reverzibilisen egymásba átalakuló konformációjuk van. A fitokrómok a citoplazmában szintetizálódnak a fiziológiailag inaktív, vörös fényt elnyelő (Pr) formában, míg egy foton elnyelésével a fotokonverzió folyamata során a fiziológiailag aktív, távoli vörös fényt elnyelő (Pfr) formába alakul át. A Pfr konformáció, távoli vörös fényt elnyelésével ismét Pr formává alakul vissza, vagy egy alternatív lehetőségként, fény hiányában egy lassú, sötét visszaalakuláson megy keresztül, ami ugyancsak a Pr formát eredményezi. Míg a

fitokrómok Pr formája a citoplazmában található, addig a Pfr forma áthelyezdik a sejtmagba, amely döntő fontosságú az információvív elemekkel való kölcsönhatásban, és ezáltal a transzkripcionális kaszkád elindításában (Nagy és Schafer, 2002; Wang és Deng, 2002; Chen és mtsai., 2004).

A fitokróмокat két típusba sorolják: az I típusú, fotolabilis fitokrómok fényben gyorsan degradálódnak, míg a II típusú fotostabil fitokrómok viszonylag stabilak maradnak. Az *Arabidopsis* genomja által kódolt öt fitokróm közül a PhyA az I-es típusba, míg PhyB-t 1 a PhyE-ig a II-es típusba tartozik (Chen és mtsai., 2004).

#### 2.1.1.2. A kriptokrómok

A kék/UV-A érzékelő kriptokrómok általánosan megtalálhatóak a növényekben, állatokban és baktériumokban. Habár strukturálisan a DNS fotoliázokkal mutatnak rokonságot, a kriptokrómok nem rendelkeznek DNS repair aktivitással (Sancar, 2003). Az N-terminális fotoliáz homológ régió (PHR) két, nem kovalensen kötött kromofort hordoz: az első a katalitikus flavin-adenin dinukleotid (FAD), a második pedig a fénybegyűjtő kromofor, a pterin vagy deazaflavin (Lin és Shalitin, 2003; Liscum és mtsai., 2003). A jel befogásának és továbbításának fotokémiai mechanizmusát még nem tárták fel, de hasonlóan a fotoliázokhoz, valószínűleg egy redoxreakciót foglal magába (Chen és mtsai., 2004). A PHR domain mellett, a legtöbb növényi kriptokróm C-terminálisán egy változatos toldalékot is hordoz, amely a fotoliázokban nincs jelen, de nélkülözhetetlen a kriptokrómok működéséhez, legalábbis az *Arabidopsis*-ban megtalálható két kriptokróm, a Cry1 és Cry2 esetében (Gyula és mtsai., 2003; Lin és Shalitin, 2003; Liscum és mtsai., 2003). A két kriptokróm a fényviszonyoktól függően eltérő lokalizációt mutat, a Cry1 sötétben elsősorban a sejtmagban, fényben pedig főleg a citoplazmában található meg, míg a Cry2 konstitutívan a sejtmagban helyezkedik el (Chen és mtsai., 2004; Jiao és mtsai., 2007). A sejtmagban lokalizálódott kriptokrómok szoros kölcsönhatásban vannak a kromatinnal (Lin és Shalitin, 2003). Hasonlóan a fitokrómok különböző osztályaihoz, a két kriptokróm ugyancsak eltérő fénystabilitást mutat: a Cry1 fénystabil, míg a Cry2 gyorsan degradálódik kék fényben (Gyula és mtsai., 2003; Lin és Shalitin, 2003). Az *Arabidopsis*-ban található egy harmadik kriptokróm, a Cry3, melynek feltételezhetően a mitokondriumok és kloroplasztok transzkripciójának szabályozásában van szerepe (Kleine és mtsai., 2003).

### 2.1.1.3. A fototropinok

A fototropinok ugyancsak kék/UV-A fényelnyelő flavoproteinek, melyekből az *Arabidopsis*-ban kettőt találhatunk meg, a Phot1 és Phot2-t (Briggs és Christie, 2002; Liscum és mtsai., 2003). A fototropinok C-terminálisán egy klasszikus Ser/Thr kináz domain található, míg az N-terminális két LOV (LIGHT, OXYGEN, VOLTAGE) domain hordoz. A fény elnyelését követően átmenetileg kovalens kötés alakul ki a LOV magjában lévő, konzervált cisztein és a flavin-adenin-mononukleotid (FAM) kromofor között, amely aztán viszonylag lassan visszaalakul az alapállapotba (Chen és mtsai., 2004). A jel befogásakor a Phot1 és Phot2 is egy autofoszforiláción megy keresztül, amely valószínűleg a jelátviteli folyamatok kezdő lépése. Mindkét fototropin elsődlegesen a plazmamembránban helyezkedik el, de fényaktivációra a Phot1 egy frakciója kioldódik a citoplazmába (Chen és mtsai., 2004).

### 2.1.2. Fotoreceptor által közvetített fényválaszok

Mindhárom fotoreceptor család fényérzékelése specifikus válaszokat válthat ki. A legtöbb fejlődési folyamat során azonban egynél több fotoreceptor vesz részt a fény érzékelésében, ami a különböző fényindukált utak közötti kölcsönhatások komplex hálózatát eredményezi. Például a magok csírázásának és az árnyék kerülésének folyamatát kizárólag a fitokrómok szabályozzák, részben a PhyA, és részben a PhyB és PhyE működésén keresztül (Wang és Deng, 2002; Chen és mtsai., 2004). Nagy intenzitású kék fényben elsődlegesen a Cry1 fotoreceptor működik, míg kis intenzitású kék fényben a Cry2 a lényegesebb. A transzkripciós program kék fény közreműködésével történő átalakítása főként a Cry1 és Cry2 fotoreceptorokon keresztül valósul meg, de kisebb mértékben a fototropinok és a PhyA is hozzájárul ehhez a folyamathoz (Chen és mtsai., 2004). Elsődlegesen a két fototropin közvetíti a fényindukált görbülést. A Phot1 az alacsony intenzitású kék fényre specializálódott, és a fototropizmus mellett közvetíti az alacsony intenzitású fény befogását elmozdító kloroplaszt-felhalmozódás választ. Ezzel szemben a nagy intenzitású fényválaszokban a Phot2 jut nagyobb szerephez, amely a kloroplasztok kiiktatásával minimálisra csökkenti a nagy intenzitású fény által okozott kloroplaszt károsodást (Briggs és Christie, 2002). A fototropizmus és a kloroplaszt mozgások választ is módosítják mind a kriptokrómok, mind a fitokrómok (Chen és mtsai., 2004). A fototropinok szabályozzák a kék fény által irányított sztómanyitást is, de ebben a válaszban is részt vesznek más fényérzékelési rendszerek, köztük a feltételezett UV-B receptor(ok) is (Briggs és Christie, 2002; Eisinger és mtsai., 2003; Ulm, 2006). Emellett a Phot1 más fotoreceptorokkal együttesen átmenetileg részt vesz a fény által közvetített hipokotilnövekedés gátlásában, illetve a fototropinok szerepe

megfigyelhet a sziklevek és levelek expanziójában is (Briggs és Christie, 2002; Chen és mtsai., 2004).

A fotoreceptorokon keresztül szabályozott mechanizmusok összetettségét az a tény is alátámasztja, hogy ugyanazon fotoreceptor család különböző tagjai alapvetően ugyanazt a szignált közvetítik, bár túlnyomóan eltérő fiziológiai válaszokat szabályoznak, ugyanakkor ugyanazon vagy eltérő családok különböző receptorai, melyek különböző fényminőségeket érzékelnek, közreműködhetnek ugyanabban a fényválaszban (Quail, 2002b). Például a csíranövények megerősödését a PhyB szabályozza, jellemzően a vörös fényválaszon keresztül, míg a PhyE szerepe vörös fényben a szár megnyúlásának szabályozására korlátozódik. Ezzel szemben a deetiolációs folyamat irányításában részt vesz a fitokróm család távoli vörös fényt érzékelő PhyA receptora a vörös fényt érzékelő PhyB és PhyC, valamint a szabályozáshoz hozzájárul a kék fényt érzékelő Cry1 és Cry2 is (Quail, 2002b; Wang és Deng, 2002; Chen és mtsai., 2004). Mindemellett a fény és más környezeti szignálok gyakran közösen vesznek részt egy-egy specifikus fejlődési válasz közvetítésében, mely jól jelzi ezek között a jelátviteli utak közötti kapcsolódási pontok meglétét (Kuhlmann és Müller, 2009).

### **2.1.3. Fény által indukált komplex jelátviteli utak és transzkripcionális hálózatok**

A morfológiai és fejlődési változásokkal összhangban, a fény indukálja a növény transzkripciójának átfogó átprogramozását, amely az *Arabidopsis*-ban a teljes genom legalább 20%-ának elkülönült expresszióját eredményezi, és ami végezetül a sötét-fény átmenet főbb biokémiai útvonalainak összehangolásához vezet (Ma és mtsai., 2001; Tepperman és mtsai., 2001; Jiao és mtsai., 2005). A fotoreceptorok működéséről és az alatta elhelyezkedő szabályozó folyamatokról szerzett ismereteink legnagyobb része a deetioláció folyamatának, mint a növények kezdeti fejlődési lépésének a vizsgálatából származik. A fényválaszok közben láncszemeinek azonosítását célzó genetikai screen-ek számos elemet azonosítottak. Például a FAR1 (FAR-RED IMPAIRED RESPONSE), az FHY3 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED LIGHT3) és az R2R3-myb transzkripciósfaktor LAF1 (LONG AFTER FAR-RED LIGHT1) a távoli vörös fény jelátvitel PhyA specifikus szabályozói (Quail, 2002a; Jiao és mtsai., 2007). A PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) transzkripciósfaktorok a fitokróm jelátvitel negatív szabályozóiként hatnak. Egy másik fitokróm választ szabályozó a COG1 transzkripciósfaktor, amely negatívan szabályozza a PhyA és PhyB választ is, míg a SUB1 a PhyA és a kriptokróm jelátviteli utak negatív szabályozója. A fotoreceptorok által közvetített jelátviteli utak szabályozóiként nem csak transzkripciósfaktorokat azonosítottak. A SPA1 proteinek és az EID1 F-box proteinek a PhyA jelátvitel negatív regulátorai, amelyek



feltételezhetően a PhyA út komponenseinek proteolitikus eliminációjának szabályozásán keresztül hatnak (Gyula és mtsai., 2003). A fent említett elemek legtöbbször közvetlen kapcsolatot mutatnak a fotoreceptorokkal, és úgy tűnik, a jelátvitel korai szakaszában elhelyezkedő láncszemek nagy része specifikusan kötődik az egyes jelátviteli utakhoz. A jelátvitel későbbi szakaszaiban ezek a különálló utak integrációs pontokban futnak össze, és közösen vesznek részt egy-egy válasz közvetítésében.

A HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) a fotomorfogenezis első, és legintenzívebben vizsgált pozitív szabályozója. A *hy5* mutánsok részlegesen etiolált fenotípust mutatnak valamennyi fényminőség közöttük az UV-B alatt is, ami azt jelzi, hogy a HY5 a fotoreceptor családok összetett útjainak alsóbb régiójában játszik szerepet (Oyama és mtsai., 1997; Ang és mtsai., 1998). A HY5 feltételezhetően integrációs pontként szerepel a fény és hormon jelátvitelben (Cluis és mtsai., 2004). Ez a bZIP transzkripciósfaktor, részt vesz a fény által indukált gének mintegy 20%-ának a szabályozásában (Ma és mtsai., 2002), mely a legtöbb gén esetében feltehetően a promóter régióhoz való közvetlen kapcsolódása révén valósul meg. Egy tipikus szabályozó régió a G-box, amely a fényszabályozás alatt álló gének széles körében (CHS, RBCS-1A) általánosan megtalálható (Ang és mtsai., 1998). A HY5 részt vesz számos UV-B toleranciához kapcsolódó gén, közöttük a fotoliázokat kódoló PHR1 és az UVR3 (Britt 2004), a flavonoid bioszintézis számos génjének, CHS, CHI, PAL1, PAL2 (Winkel-Shirley, 2002), és transzkripciósfaktoraik (Mehrtens és mtsai., 2005) szabályozásában is.

A CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) E3 ubikvitin-ligáz, kölcsönhatásba kerülve a HY5-al, sötétben elősegíti annak az ubiquitin/26S proteasóma rendszerben történő degradációját (Osterlund és mtsai., 2000). A fény egyrészt inaktiválja ezt a folyamatot, és így a HY5 protein stabilizálódik, másrészt a HY5 gyors transzkripcionális aktiválását eredményezi (Tepperman és mtsai., 2001; Jiao és mtsai., 2007). Emellett a HY5 fehérje egy fény szabályozás alatt álló kináz aktivitás során foszforilálódik, amely sötétben nevelt csíranövények esetében még kifejezettebb. Ez a folyamat gyengíti a COP1-HY5 kölcsönhatást, és így stabilizálja a HY5-öt. Viszont a foszforilált HY5 protein kevésbé eredményesen kötődik a cél promóterekhez. Így egyrészt a szabályozott HY5 foszforiláció, összhangban a fényindukált transzkripcióval, fényben gondoskodik a fiziológiailag aktívabb HY5 protein bőséges jelenlétéért, míg sötétben segít fenntartani egy kevésbé aktív, de sokkal stabilabb foszforilált protein pool-t, mely fény esetén biztosítja a gyors válaszokat (Hardtke és Deng, 2000). A HY5 protein jelenléte a csíranövények korai fejlődési szakaszában, a csírázást követően 2-3 napon a legintenzívebb, ezt követően szintje lecsökken, majd virágzáskor mutat újra magasabb értéket. Ez alátámasztja azt a megfigyelést, mely szerint a *hy5* mutánsok korai

virágzás fenotípust mutatnak hosszúnappalos körülmények között (Hardtke és Deng, 2000; Holm és mtsai., 2002).

A *cop1* mutáns csíranövények teljes sötétségben is fotomorfozenikus fejlést mutatnak. A kifejlett *cop1* mutánsok fényben törpe növekedésűek, és termékenységük erősen lecsökkent a vad típushoz képest (Deng és Quail, 1992; Ang és Deng, 1994). A COP1 proteín három funkcionális domain-t tartalmaz, az N-terminálison található RING domain-t, az ezt követő coiled-coil domain-t, és a C-terminálison elhelyezkedő WD40 domain-t. A HY5 és a COP1 kapcsolódásakor a HY5 COP1-kölcsönható domain és a COP1 WD40-es domain-je között alakul ki kölcsönhatás. Ezt a két domain-t érintő mutációk a HY5 stabilizációját eredményezik (Ang és mtsai., 1998; Osterlund és mtsai., 2000; Holm és mtsai., 2001). Egy másik bZIP transzkripciósfaktor az HYH, COP1-kölcsönható motívuma ugyancsak a COP1 WD40-es domain-jéhez kapcsolódik, és sötétben degradálódik (Holm és mtsai., 2002). Az HYH fehérje 49 %-ban megegyezik a HY5-tel, tartalmazza funkcionális szempontból fontos domain-jeit és motívumait. Kimutatták, hogy főleg kék fényben, a HY5-nek és a HYH-nak egymással átfedő szerepük van, és nagyrészt együttműködve hatnak ugyanarra a géncsoportra (Holm és mtsai., 2002). Emellett más transzkripciósfaktorok, köztük a távoli vörös fény jelátvitel pozitív regulátora, a LAF1 (Seo és mtsai., 2003), vagy a kék és távoli vörös fény jelátvitel pozitív szabályozója, a HFR1 (Jang és mtsai., 2005), illetve a fotoreceptorok: PhyA, PhyB, Cry1 és Cry2, ugyancsak közvetlen kapcsolatban vannak a COP1-el (Wang és mtsai., 2001; Yang és mtsai., 2001; Seo és mtsai., 2004).

## **2.2. Az UV-B sugárzás hatása a növények növekedésére és fejlődésére**

A Nap sugárzási energiájának mintegy 10 %-a az UV tartományba esik. Ezt a régiót egyezményesen UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), és UV-C (<280 nm) részekre osztjuk. A legrövidebb hullámhosszú, és egyben legveszélyesebb UV-C sugárzást a sztratoszféra ózonrétege elnyeli, így egyáltalán nem éri el a földfelszínt. Ugyanez történik az UV-B sugárzás rövidebb hullámhosszú részével is, azonban a hosszabb hullámhosszú része, valamint az UV-A régió eléri a talajt. A Föld felszínét elérő napenergiának alig 0,5 %-a a biológiailag aktív UV-B sugárzás, ugyanakkor ez a legnagyobb energiájú sugárzás, melynek a földi élővilág ki van téve. Szintjét nagymértékben módosíthatja számos légköri, domborzati hatás, melynek következtében egy dinamikusan változó környezeti faktorról beszélhetünk (Paul és Gwynn-Jones, 2003). Az UV sugárzás káros hatásai, mint az oxidatív stressz és a széleskörű sejtkárosítás, jól ismertek. A magas energiaszintű UV-B sugárzás jelentős károsodást okozhat, az elektromágneses spektrum

ezen régiója által kiváltott válaszreakcióknak ez azonban csak egy sz k metszetét jelenti (Paul és Gwynn-Jones, 2003). Az UV sugárzás hasznosítását jól szemlélteti, hogy az UV-A és kismértékben az UV-B sugárzás is széles körben használt a táplálék felkutatására, a párválasztásban, navigációban, a ragadozók elkerülésének folyamatában, a fajon belüli kommunikációban és még a cirkadián ritmus irányításában is gerinces és gerinctelen állatfajoknál egyaránt (Tovee, 1995; Hunt és mtsai., 2001; Kevan és mtsai., 2001; Lim és mtsai., 2007). Hasonlóan az állatokhoz, a növények is hasznosítják a spektrum UV-A és UV-B régióját, mint környezeti elemet, amely szabályozza a különböző fejl dési és növekedési folyamataikat (Kim és mtsai., 1998; Boccalandro és mtsai., 2001).

Tehát az UV-B sugárzás növényekre gyakorolt hatását nagyjából két csoportba oszthatjuk: károsító (stressz) és szabályozó (nem károsító) hatásokra. A károsító hatás f leg az alacsony hullámhosszú UV sugárzás nagy energiájú fotonjainak köszönhet , amelyet számos bio-molekula elnyel. A növények törzsfajl désük során, a növekedésükhöz szükséges fényenergia hasznosítása közben, szinte állandóan ki voltak téve bizonyos mérték UV sugárzásnak, ezért ez a sugárzás természetes stresszfaktornak tekinthet . Ennek megfelelő en a növények az evolúció által próbára tett védekezési mechanizmusokkal rendelkeznek a sugárzás okozta károsodások kivédésére vagy kijavítására. Ide tartozik pl. a megfelelő növekedési habitus kialakítása, UV sz r pigmentek szintézise, a reaktív oxigéngyököket elimináló folyamatok és a fokozott DNS károsodás kijavítására kialakult mechanizmusok. Ezeknek a védelmi válaszoknak a hiányában hiperszenzitivitás, fokozott válasz esetében pedig megemelkedett UV-B tolerancia alakul ki (Li és mtsai., 1993; Landry és mtsai., 1995; Conklin és mtsai., 1996; Bieza és Lois 2001; Tanaka és mtsai., 2002; Britt és Fiscus, 2003). Másrészt l az UV-B sugárzás nem csak stresszfaktor a növények számára, hanem mint a napsugárzás része, lényeges információt hordoz az általános fényviszonyokról (Paul és Gwynn-Jones, 2003). Továbbá, köszönhet en a környezeti faktorok módosító hatásainak (az ózonréteg, a napsugarak beesési szöge, a felh zet kiterjedtsége, a leveg szennyezettség mértéke, a felszín fényvisszaver késsége, topográfiai hatások és a növény lombozata), az él szervezeteket ér UV-B sugárzás szintje nem feltétlenül azonos a fény spektrum más régióinak szintjével (Caldwell és Flint, 1994; Rozema és mtsai., 1997; McKenzie és mtsai., 2003; Paul és Gwynn-Jones, 2003).

### **2.2.1. Az UV-B által okozott DNS-károsodás és javítás**

Az UV sugárzás különböző tartományai (UV-A, UV-B, UV-C) az ket elnyel bio-molekulák elnyelési spektrumától függ en eltér mértékben járulnak hozzá a növényeket ér károsodásokhoz. Az RNS-molekulák jelent s mértékben abszorbeálják az UV-B sugárzást. Ennek eredményeként specifikus riboszómális fehérjék keresztkötéseket alakítanak ki az RNS-

sel, amely a transláció gátlásához vezethet (Casati és Walbot, 2004). Az általános translációgátlás ellenére az UV-B ezen felül indukálja a specifikus riboszómális proteinek szintézisét (Casati és Walbot, 2004). Ez azt mutatja, hogy az UV-B indukálta válaszban a sejtek megnövelik a riboszómális proteinek transzkriptumainak szelektív translációját, hogy legyenek a riboszóma károsodást, és így az UV-B káros hatásait a proteinszintézisben (Ulm és Nagy, 2005).

Az UV-B károsító hatásai közül a legismertebb a DNS-károsítás. Okozhat oxidatív károsodást (pirimidin-hidrátok), DNS-fehérje és DNS-DNS közötti keresztkötéseket, azonban a leggyakoribb hatása az azonos láncon lévő szomszédos pirimidin bázisok dimerizációja, melynek során a bázisok egy ciklobután gyűrű kialakításával kovalensen kapcsolódnak. A kialakult pár lehet ciklobután-pirimidin (CPD) vagy pirimidin-pirimidinon (6-4 PP) típusú dimer. Az UV által okozott DNS károsodások 75%-ban CPD-k kialakulásához vezetnek. A maradék 25% nagy részét a 6-4 PP (photo product) keletkezése teszi ki.

A dimerek kialakulásakor megváltozik a szomszédos lánc bázisaival alkotott bázispárok mérete, és ez a torzulás blokkolhatja a replikációt. A DNS-polimeráz haladása a láncon ezen a pontján megakad. A hiba helyétől változó távolságra 300 irányban a replikáció tovább folytatódhat, de a láncon ekkor egyfonalas szakasz, az utódfonalon rés keletkezik. Itt már nem a hiba korrekt javítása a cél, hanem egy valamennyire használható, folytonos DNS készítése, amely a későbbiekben esélyt biztosít a túlélésre. A replikációs komplex az átírást a károsodott szakaszon átterjeszt, a rendszer hibát javít, valamint beépít, hogy a genom replikációja tovább mehessen. A replikáció gátlása mellett a transzkripcionális folyamatok is károsodnak, ugyanis az RNS-polimeráz a dimerhez tartósan kötődhet, így nem csak az átírás szakad meg, hanem csökken a szabad polimeráz szint is. A DNS-károsodás kijavítására három fő mechanizmus működik. A pirimidin dimerek javítása történhet fotoreaktivációval, excíziós és rekombinációs reparálással, ugyanakkor más DNS károsodások feloldását az utóbbi két mechanizmus végzi.

#### 2.2.1.1. A fotoreaktiváció

Fotoreaktivációnak nevezzük azt a folyamatot, melynek során a pirimidin dimerek a fotoreaktiváló UVA/kék fény (350-450 nm) energiájának felhasználásával felbomlanak. A reakciót egy fajonként eltérő, 55-70 kD méretű, monomimerikus enzim, a fotoliáz végzi, amely két proszitetikus csoportot tartalmaz: egy flavin-adenin-dinukleotidot (FAD) és egy pterint, jellemzően meteniltetrahydrofolátot (MTHF) vagy 8-deazaflavint. A fotoliázok egy ciklikus elektrontranszfer mechanizmus katalizálásán keresztül bontják fel a dimereket összetartó

kötéseket. A FAD kofaktor szükséges mind a kötés felbontásához, mind a katalízishez, míg a pterin fotoantennaként működik, és elszállítja a gerjesztési energiát a katalitikus FADH számára (Sancar, 2003). Az *Arabidopsis*-ban két fotoliáz ismert, a CPD specifikus PHR1/UVR2 és a 6-4 PP specifikus UVR3 (Ahmad és mtsai., 1997; Nakajima és mtsai., 1998). A PHR1/UVR2 transzkripcióját a fehér fény és az UV-B is indukálja, míg az UVR3 konstitutívan expresszálódik (Ahmad és mtsai., 1997; Tanaka és mtsai., 2002; Waterworth és mtsai., 2002; Britt, 2004). Mint az UV-B által indukált DNS-károsodást javító enzimek kódolói, mind az *uvr2*, mind az *uvr3* mutáns határozottan UV-B szenzitív (Ahmad és mtsai., 1997; Nakajima és mtsai., 1998). Az *uvr1uvr2* és *uvr1uvr3* dupla mutánsok vizsgálata, ahol az *uvr1* a *šsötét repair*-ben hiányos mutáns, kimutatta, hogy a CPD-k javításában hibás *uvr1uvr2* mutánsok fotoreaktiváló körülmények között sokkal nagyobb érzékenységet mutatnak UV-B besugárzás hatására, mint az *uvr1uvr3* mutánsok, amelyek az eredmények szerint a DNS-javítás szempontjából kevésbé kiemelkedő 6-4 PP-k javításában sérültek.

#### 2.2.1.2. Az excíziós repair mechanizmus

Más típusú DNS károsodások esetében a javítás során a hiba kivágásra kerül, és az így keletkező hiány a sértetlen szál mint templát alapján pótlódik. Az excíziós repair speciális esete a báziskivágó javítás vagy BER (base excision repair), melyet lézióspecifikus glikozilázok végeznek (Britt, 2002). Ezek az enzimek a bázis és a deoxiribóz közötti N-glikozidos kötést hasítják és ezzel egy apirimidin (más esetben apurin), közös néven AP hely keletkezik. Az AP helyet az AP endonukleáz ismeri fel és a folytonos cukor-foszfát gerincet elhasítja. Ezzel egy rés keletkezik a DNS kettős szálán. Ezen a helyen egy exonukleáz néhány bázist eltávolít, majd az újraszintetizáláshoz a sértetlen szál szolgál templátul.

Az excíziós repair egy másik mechanizmusa a nukleotidkivágó javítás vagy NER (nucleotide excision repair). Ez a folyamat magában foglalja a DNS-károsodás felismerését, a károsodott helyhez közeli rövid DNS régió letekerését, a 3' és 5' endonukleázok bekötését, amelyek bemetszik és eltávolítják a sérült régiót, a sértetlen szál, mint templát alapján, az adott szakasz újraszintetizálását és végül a ligációt. Ez a folyamat, amely számos protein összehangolt együttműködését igényli, nélkülözhetetlen az UV által okozott DNS-károsodás kijavításához a fotoliáz aktivitással nem rendelkező lények, mint pl.: az ember számára is. A mechanizmus komponenseinek hiánya egy örökletes rendellenességet, a xeroderma pigmentosum-ot (XP) eredményezi. Az XP betegek extrém UV érzékenységekben szenvednek és megnövekedett hajlamuk van a bőrrákra (Friedberg, 2001). Az *xp* mutánsok hét komplementációs csoportja és bizonyos *rad* mutánsok a NER különböző komponenseit képviselik. Számos UV hiperszenzitív

*Arabidopsis* mutánsnak, amelyek a NER mechanizmus elemeiben érintettek, megvannak a humán/élesztés megfelelői. Az *Arabidopsis* UVH6 homológja megfelel az XPD/RAD3. 5030 DNS-helikáz aktivitással rendelkezik, amely a sérült DNS kitekeréséért felelős (Liu és mtsai., 2003; Sancar és mtsai., 2004). Az UVH1 és UVR7 homológ párijai az XPF/RAD1 és ERCC1/RAD10, amelyek a károsodott DNS szál 50 bemetszését végzik (Fidantsef és mtsai., 2000; Liu és mtsai., 2000; Hefner és mtsai., 2003; Sancar és mtsai., 2004). A NER rendszer tehát funkcionálisan konzerválódott a növényekben is, amely még a fotoreaktiváló fény hiányában is biztosítja a DNS-sérülések, főképpen a 6-4 PP-k javítását, amiért gyakran 50ötét repair0-nek nevezik (Britt, 2004).

### 2.2.1.3. Rekombinációs repair

A genotoxikus UV-B sugárzás további káros hatása a DNS kettős szál törése, amely bekövetkezhet pl.: a sugárzás következtében kialakult reaktív oxigéngyökök, különösen a hidroxil gyökök erős oxidáló hatása következtében. Az ilyen DNS-károsodások legtöbbször a törés két vége a nem homológ végek összekapcsolódása, röviden NHEJ (non-homologous end joining) mechanizmuson keresztül rögzül, majd a DNS eredeti állapota homológ rekombinációs (HR) javítással áll helyre (Bray és West, 2005; Schuermann és mtsai., 2005). *Arabidopsis*-ban megfigyelték, hogy nagy dózisban adott UV sugárzás esetén megemelkedik a szomatikus homológ rekombinációk száma, amely azt jelzi, hogy a növények is használják a HR-t az UV-B által okozott DNS károsodások javításához (Ries és mtsai., 2000).

### 2.2.2. Nem károsító, fotomorfogénikus UV-B válaszok és UV-B érzékelés

A szabadföldi körülmények között nevelt növények alkalmazkodnak a természetes UV-B sugárzás szintjéhez. A morfogénikus válaszok ezeknek az alkalmazkodási folyamatoknak a részei, feltehetően hozzájárulnak a növények UV-B sugárzás elleni védelméhez. Ide sorolhatjuk a hipokotil megnyúlásának gátlását, a sziklevelek expanzióját, a fototropikus görbülést, a sztómanyílás mozgásait, a levél és kacs csavarodását, a levelek megvastagodását, a hónalj elágazódások számának növekedését és az UV védő pigmentek produkciójának indukcióját is (Li és mtsai., 1993; Wilson és Greenberg, 1993; Beggs és Wellmann, 1994; Ballare és mtsai., 1995b; Brosche és Strid, 2000; Mazza és mtsai., 2000; Eisinger és mtsai., 2003; Shinkle és mtsai., 2004). Nem minden növényfaj reagál azonban azonos módon az UV besugárzásra. *Triticum aestivum* és *Avena sativa* fajok esetében kiegészítő UV-B fényben a hajtás méretének csökkenését, míg *Amaranthus retroflexus* és *Kochia scoparia* esetében a hajtás megnyúlását

figyelték meg. Mind a négy faj esetében a t és oldalhajtások száma növekedett az UV-B hatására (Barnes és mtsai., 1990). Általában az egyszik növények érzékenyebben reagálnak az UV-B-re mint a kétszik ek. A közeli rokon fajok vagy ökotípusok is különbözhetnek az UV-B-re adott morfogénikus válaszok tekintetében (van de Staaij és mtsai., 1997).

Az UV-B által indukált morfogénikus válaszok spektrális optimuma 300 nm körül van, ami nem egyezik meg a DNS-károsítás optimumával. Ez a tény alátámasztja azt az elképzelést, mely szerint a morfogénikus válaszok a károsítástól független jelátviteli úton keresztül szabályozottak. Az UV-B által indukált hipokotil növekedés gátlása paradicsomban egy viszonylag gyors folyamat, 300 nm körül éri el maximumát, az UV véd pigmentek szintézisét is megel zve (Ballare és mtsai., 1995a; Ballare és mtsai., 1995b). Uborkában ugyanez a válasz gibberelinsav alkalmazásával visszafordítható és nem eredményez kísér körülményként változást a szárazanyag termelésében. Megállapították, hogy a megnyúlás gátlása f leg a sziklevelek UV-B érzékeléséb l, és nem a csúcsmerisztéma vagy a megnyúló sejtek károsodásából adódik, ami azt mutatja, hogy ez egy valódi UV-B-re adott fotomorfogénikus válasz (Ballare és mtsai., 1991). Továbbá megfigyelték, hogy a sziklevelek expanzióját, amely egy tipikus fotomorfogénikus fenotípus, az alacsony intenzitású UV-B sugárzás el segíti, míg a károsító hatású, nagy intenzitású UV-B esetén ez nem volt megfigyelhet (Kim és mtsai., 1998). Ezzel összhangban, napi 2,5 órás, alacsony intenzitású UV-B besugárzás, melyet egy rövid, vörös fényimpulzus követett, a sziklevelek fokozatos szétnyílását eredményezte, míg a magasabb intenzitású besugárzás gátolta. Eredményeiket ábrázolva, egy harang alakú intenzitás görbét kaptak (Boccalandro és mtsai., 2001). A nagy intenzitású UV-B sugárzásra adott hipokotil növekedési válaszok, valamint a sziklevelek expanziójának gátlása az összetett *uvr1uvr2* és *uvr1uvr2* DNS-repair mutánsokban fokozott volt. Következésképpen, azok a besugárzási kondíciók, ahol a DNS-repair mutánsok nem mutattak megnövekedett érzékenységet, olyan UV-B szinteket jelentenek, amelyek a szabályozó UV-B válaszokat indukálják, számottev DNS-károsodás nélkül (Boccalandro és mtsai., 2001).

Ezek a fotomorfogénikus válaszok, amelyeknek az intenzitásfüggése már alátámasztott, függetlennek t nnek a már ismert fotoreceptoroktól, mint azt a PhyA, PhyB, Cry1, Cry2 és Phot1 fotoreceptormutánsok hipokotil növekedés gátlása mutatja (Suesslin és Frohnmeyer, 2003; Oravecz és mtsai., 2006). Azonban van egy kétségtelen vita a PhyA és a PhyB közrem ködését illet en, ugyanis hasonló kísérletekben a *phyAphyB* dupla mutánsok hipokotilja kis intenzitású UV-B kezelés esetén hosszabb volt, mint a vad típusú egyedeké (Kim és mtsai., 1998).

Az alacsony intenzitású UV-B besugárzás, melyet egy rövid vörös fényimpulzus követett, fokozta a sziklevelek expanzióját. Míg ez a válasz gátolt volt a phyB mutánsokban, addig a többi ismert fotoreceptortól független volt (Boccalandro és mtsai., 2001). Lehetséges, hogy a PhyB

által közvetítet expanziós választ egy független UV-B érzékel receptor rendszer szinergesztikusan fokozza (Ulm, 2006).

Az UV-sz r pigmentek szintézise a növények UV-B sugárzás elleni védekez mechanizmusainak egyike. Mindez az általános fenilpropanoid-bioszintézis út aktiválódásának eredményeként valósul meg, melynek során különböz flavonoidok és mustár-észterek keletkeznek (Winkel-Sirley, 2002). Ezek az anyagok fként az epidermális sejtrétegekben halmozódnak föl, és az UV-B hullámhossz tartományban történ elnyelésüknek köszönhet en védik az alsóbb szöveteket. Míg a napsugárzás káros részeit kisz ríri, a fotoszintetikusan aktív sugárzást átengedik.

A flavonoidok felhalmozódása általános jellemvonása a növényi stresszválaszoknak, és mint a másodlagos anyagcseretermékek változatos csoportja, rengeteg biológiai funkcióval rendelkeznek. Az UV-B sugárzás elleni védekezés mellett a flavonoidoknak szerepük lehet a mikroorganizmusok elleni védelemben, m ködhetnek antioxidánsként, szabályozzák az auxintranszportot, és alapvet szerepük lehet a beporzást és a magterjesztést végz állatok vonzásában (Winkel-Shirley, 2002).

Az UV-B által kiváltott flavonoid produkció egy alaposan tanulmányozott UV-B indukálta fotomorfogénikus hatás, melyet a feltételezett UV-B fotoreceptor közvetít (Beggs és Wellmann, 1994; Björn, 1999). Petrezselyem sejtszuspenziós kultúrában és csíranövényekben, valamint számos más növényi rendszerben is kimutatták, hogy az UV-B által indukált flavonoid-felhalmozódás egy olyan akcióspektrummal rendelkezik, amely a maximumát 300 nm körül éri el, hasonlóan a fent említett hipokotil növekedés gátlás és a sziklevel expanziós válaszokhoz (Begs és Wellmann 1994; Kucera és mtsai., 2003). *Arabidopsis*-ban ugyancsak megemelkedett a fenilpropanoid produkció szintje UV-B besugárzás hatására (Lois, 1994; Suesslin és Frohnmeyer, 2003). Továbbá ebben a válaszfolyamatban felmerül hiányosságok vagy fokozott m ködés UV-B hiperszenzitivitást vagy hiposzenzitivitást eredményez (Li és mtsai., 1993; Landry és mtsai., 1995; Jin és mtsai., 2000; Bieza és Lois, 2001; Kliebstein és mtsai., 2002). A fenilpropanoid út egyik kulcsenzime a kalkon-szintáz (CHS) amely transzkripcionálisan indukálódott UV-B pulzusok hatására petrezselyem sejtekben (Frohnmeyer és mtsai., 1999). Fontos, hogy ezek között a kísérleti körülmények között a DNS-károsodás kialakulása minimális volt, és a CHS indukció elkülöníthet volt a pirimidin dimerek képz dését l (Frohnmeyer és mtsai., 1999). Ehhez hasonlóan az UV-B-vel kezelt *Argenteum pea* esetében sem találtak összefüggést a pirimidin dimerek szintje és a CHS transzkriptumának szintje között (Kalbin és mtsai., 2001). Az ugyancsak ismert, hogy a fotoreaktiváló UV-A és kék fény jelenléte fokozza a CHS indukcióját (Wade és mtsai., 2001). Mindez azt mutatja, hogy az UV-B besugárzás által eredményezett génexpresszió és DNS-károsodás között nincs összefüggés. Az UV-B mellett a



vörös/távoli vörös és a kék/UV-A fény is szabályozza a CHS expresszióját, így tehát a fitokróm, kriptokróm és UV-B jelátviteli utak egyaránt résztvesznek a fénysz r pigmentek képz déséért felel s kulcsenzim transzkripció s szabályozásában (Jenkins és mtsai., 2001). A CHS expressziójának szabályozásán keresztül lehet ség nyílik az UV-B által kiváltott, illetve a fényspektrum más tartományai által indukált folyamatok kölcsönhatásainak vizsgálatára (Jenkins és mtsai., 2001).

Mindent egybevéve megállapítható, hogy számos tény utal egy specifikus UV-B érzékel rendszer jelenlétére, amely elkülöníthet a károsító folyamatoktól és a már ismert, látható fény érzékelésében résztvev fotoreceptoroktól is. Bár jelenleg még ismeretlen az UV-B fotoreceptor, az UV-B fotobiológia arra a tényre támaszkodik, hogy a leírt UV-B kezelések körülményei, melyek specifikus válaszreakciókat indukálnak, jól elkülöníthet ek a károsodást eredményez kt l (Ulm, 2006). A morfogénikus UV-B érzékelés természetét illet en csábító lehet ségként merül fel egy protein-pigment complex részvétele az érzékelésben, hasonlóan a már ismert fotoreceptorokhoz. A lehetséges kromoforokban egy tetrahidroprotein-származék (Galland és Senger, 1988b; Björn, 1999) vagy egy flavin részvételét feltételezik (Galland és Senger, 1988a; Ensminger és Schäfer, 1992; Ballare és mtsai., 1995a). Ezt támasztja alá az is, hogy ezeknek az összetev knek a maximális elnyelése összhangban van számos UV-B válasz akcióspektrumával, ahol a legnagyobb hatékonyság 300 nm körül figyelhet meg (Galland és Senger, 1988a,b). Továbbá UV-B-vel kezelt petrezselyem sejtekben magasabb CHS és flavonoid szintet mértek, amennyiben riboflavint adagoltak a sejt kultúrához (Ensminger és Schäfer, 1992). Paradicsommal végzet kísérletekben a pterinek és flavinok normál összetételét megzavaró vegyületek az UV-B által közvetített hajtásmegnyúlás gátlásának gyengítését eredményezték (Ballare és mtsai., 1995a). Mindezek tisztázásához az UV-B receptor molekula azonosítása szükséges.

### **2.2.3. Az UV-B jelátvitel lehetséges közvetít i**

Az UV-B sugárzás közvetlen vagy közvetett érzékelése specifikus jelközvetít k aktiválásán keresztül vezet a megfelelő válaszok ó génaktiválás, represszállás ó kiváltásához. Ismereteink meglehetősen hiányosak ezeket az utakat illet en. Ezenkívül a morfogénikus válaszokat közvetít és a károsítás által indukált jelátviteli folyamatok elkülönítése is gyakran bizonytalan. Az UV-B által indukált jelátviteli folyamatok, illetve számos más környezeti inger, mint pl. a patogének vagy növényev k károsításai ó által kiváltott utak összefutása további példa az ilyen válaszok összetett természetét illet en (Kuhlmann és Müller, 2009). Számos tanulmány, továbbá különböző mutáns és transzgénikus növények analízise kapcsolódik az UV-B válaszok különféle

közbens láncszemeihez. Ide tartoznak például a reaktív oxigénformák (ROS), a nitrit-oxid, kalcium/kalmodulin, a reverzibilis foszforilációs események és a növényi hormonok (Brosche és Strid, 2003; Frohnmeyer és Staiger, 2003; Ulm, 2006).

#### 2.2.3.1. Reaktív oxigénformák

A ROS képzése a magas energiaszint UV-B sugárzás egyik hatása, és részben ez a felelős az UV-B károsító jellegéért. Emellett a reaktív oxigénfajták mint másodlagos hírvivők is részt vesznek jelátviteli folyamatokban (Hideg és mtsai., 2002). Számos tanulmány utal arra, hogy a ROS képzése számos UV-B válaszban szereplő gén aktiválásához illetve repressziójához szükséges, ezzel szemben az UV-B által indukált CHS gén aktivációja nem része ennek az oxidatív stressz jelátvitelnek (A-H-Mackerness, 2000; A-H-Mackerness és mtsai., 2001; Jenkins és mtsai., 2001). Így tehát valószínűsíthető, hogy az UV-B által indukált károsító reakciók magukban foglalják a ROS közvetítette jelátvitelt, míg a morfogénikus UV-B válaszok függetlenek tőle. A ROS azonban különösen, mint potenciális másodlagos hírvivő, UV-B válaszban betöltött sajátos szerepe, valamint enzimatis vagy nem enzimatis eredete mindmáig bizonytalan.

#### 2.2.3.2. Hormonok

A nagy intenzitású UV-B sugárzás által kiváltott oxidatív stressz jelátvitel downstream régiójában kapnak szerepet a szalicilsav, jázmonsav és az etilén növényi hormonok (Surplus és mtsai., 1998; A-H-Mackerness és mtsai., 1999). Ezek a hormonok, UV-B besugárzást követően részt vesznek patogénválaszhoz kapcsolt gének génexpressziós szabályozásában, de nem szükségesek az UV-B közvetítette CHS indukcióhoz (A-H-Mackerness és mtsai., 1999). Emellett igazolták, hogy a sértetlen jázmonsav és etilén útvonalak szükségesek az UV-B károsító hatásai elleni védelemben (A-H-Mackerness és mtsai., 1999). A patogén és a növények károsításai által indukált jelátviteli utakkal mutatott hasonlóságok megosztott komponensek bevonását és egy lehetséges kereszttolerancia mechanizmusának jelenlétét jelzik (A-H-Mackerness és mtsai., 2000; Kuhlmann és Müller, 2009).

#### 2.2.3.3. Kalcium

Tranziens UV-B besugárzás a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) szintjének fokozatos és hosszan tartó növekedését eredményezte petrezselyem sejt kultúrákban (Frohnmeyer és mtsai., 1999). Ez a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintemelkedés szükséges az UV-B válaszban szereplő CHS aktivációhoz (Frohnmeyer

és mtsai., 1999), de önmagában nem elegendő a CHS indukció kiváltásához *Arabidopsis* sejtkultúrában (Christie és Jenkins, 1996), amely az UV-B stimulusnak mint elsődleges ingernek a szükségességét jelzi. Érdekes, hogy szemben az UV-B sugárzással, vörös fény kezelés esetén a fitokróm közvetítette CHS indukcióban a kalcium/kalmodulin negatív szabályozó szerephez jut. A két mechanizmus különbözik a CHS indukció kinetikájában, illetve abban is, hogy az UV-B által közvetített CHS aktiváció újonnan fehérjeszintézist igényel (Frohnmeier és mtsai., 1998).

#### 2.2.3.4. Foszforiláció

Az UV-B jelátvitelben foszforilációs folyamatokról is beszámolnak (Christie és Jenkins, 1996; Frohnmeier és mtsai., 1997; 1998). A MAP (mitogen-activated protein) kinázok egy csoportjáról kimutatták, UV-B inger hatására aktiválódnak (Stratmann, 2003; Ulm, 2003). A MAP-kináz utak három lépcsős foszfátcsoporthoz tartozó rendszerének fontos szerepe van a belső és külső ingerek széles körében, köztük az UV-B jelátvitelében is (Bode és Dong, 2003). A MAP-kinázok UV-B válasz során bekövetkező aktivációjáról paradicsomban (Stratmann és mtsai., 2000), míg UV-C esetén dohányban és *Arabidopsis*-ban számoltak be (Miles és mtsai., 2002; Ulm és mtsai., 2002). A paradicsomban leírt LeMPK1 és 2 MAP kinázok aktiválódnak UV-B besugárzás valamint sebzés hatására és a patogénválasz során is (Holley és mtsai., 2003). Az LeMPK1/2 dohány ortológját a SIPK-t az UV-C aktiválja, melynek feltétele a ROS-produkció (Miles és mtsai., 2002). Az *Arabidopsis* homológ AtMPK6 transzkripcionálisan aktiválódik UV-C, ROS (Kovtun és mtsai., 2000; Yuasa és mtsai., 2001; Ulm és mtsai., 2002), valamint UV-B hatására is, bár ez utóbbi eset feltehetően független az oxidatív stressztől (Desikan és mtsai., 2001). Érdekes, hogy a LeMPK3 csak UV-B hatására aktiválódik paradicsomban, ami alapján ez a kináz feltételezhetően egy UV-B specifikus elem (Holley és mtsai., 2003). Ezek a példák jól mutatják a MAP-kinázok jelenlétét az UV-B jelátvitelben, de a stresszválaszokkal való pontos kapcsolatuk meghatározása még hátra van.

#### 2.2.3.5. Nitrogén-monoxid

A nitrogén-monoxid (NO), fontos, másodlagos hírvivő szerepet tölt be a fiziológiai folyamatokban, a fejlődéstől egészen a védekezésig (Wendehenne és mtsai., 2001), részvétele szükséges a CHS gén UV-B indukciójához *Arabidopsis*-ban (A-H-Mackerness és mtsai., 2001). Továbbá ismert, hogy a S-nitrosoglutation és a S-nitroso-N-penicillamin kezelés, amely NO-t képez, UV-B nélkül a CHS gén aktivációját eredményezi (A-H-Mackerness, és mtsai., 2001).

Tehát a NO részvétele az UV-B jelátvitelben kimutatott, azonban további kutatások szükségesek az UV-B válaszon belüli jelentőségének tisztázásához.

#### 2.2.4. Az UV-B jelátvitel ismert, genetikailag meghatározott elemei

Szemben a látható fény érzékelésével és az azt követő jelátviteli folyamatokkal, az UV-B által elidézett, genetikailag alátámasztott folyamatokról rendelkezésünkre álló ismeretanyag elég csekély. Mindez elsősorban a jól definiált UV-B fenotípusok kis számából, illetve az UV-B kezelések károsító hatásából adódik. Néhány genetikai szűri vizsgálat vagy különböző fenotípusos változásokra, vagy riportergén-fúziós konstrukciókra támaszkodva, feltárta az UV-B jelátvitelhez kapcsolódó első komponenseket. A mutánsok azonosítására irányuló törekvéseknek két fő megközelítése volt: a hosszantartó UV-B sugárzással szembeni tolerancia változásait, illetve eltérő fenotípusos válaszok megjelenését kísérték figyelemmel. Ezek a tanulmányok vezettek például a DNS-repair mutánsokhoz, a fényvédő metabolitokat megemelkedett, vagy éppen csökkent szinten előállító, illetve az UV-B által indukált hipokotilnövekedés gátlás válasz módosulását mutató mutánsokhoz (Britt, 2004; Jin és mtsai., 2000; Kliebstein és mtsai., 2002; Suesslin és Frohnmeyer, 2003; Wade és mtsai., 2003; Brown és mtsai., 2005).

##### 2.2.4.1. Az UV-B válaszok negatív szabályozó elemei

Az UV-B jelátvitel egyik, genetikailag elsőként azonosított eleme a MYB4 transzkripciós faktor volt *Arabidopsis*-ban (Jin és mtsai., 2000). UV-B mentes körülmények között a MYB4 represszorként hat, negatívan szabályozza célgénje, a C4H (fahéjsav-4-hidroxiláz) expresszióját, amely a fény szűri mustárészterek szintézisének egy meghatározó lépését katalizálja (Jin és mtsai., 2000). Az UV-B sugárzás azonban a MYB4 expressziójára negatívan hat, amely a C4H negatív szabályozásának megszűnéséhez, és így az UV-védő mustárészterek emelkedett szintjéhez vezet. Ennek megfelelően a *myb4* mutánsok a védő pigmentek fokozott termelését, és ezáltal megemelkedett UV-B toleranciát mutatnak, míg ezzel szemben a MYB4 túlexpresszáltatása megnövekedett UV-B szenzitivitást eredményez (Jin és mtsai., 2000).

A fenilpropanoid-bioszintézis másik negatív regulátora, az ICX1, egy CHS promóter-GUS transzgén konstrukciót felhasználó screen során lett azonosítva (Jackson és mtsai., 1995). A screen során kapott *icx1* mutáns a flavonoid bioszintézis génjeinek ó mint a CHS, PAL és DFR ó megnövekedett indukcióját mutatta számos környezeti inger hatására (Wade és mtsai., 2003). Az említett környezeti ingerek az alacsony hőmérséklet, szacharóz, citokinin, fény és ezen belül az UV-B voltak. Tehát az ICX1 a flavonoid bioszintézis általános

negatív regulátorának tekinthet. Azonban sem az *icx1* mutációt, sem az *icx* fenotípusért felelős gént nem azonosították még, így nem ismerjük molekuláris funkcióját sem.

#### 2.2.4.2. Az UV-B válaszok pozitív szabályozói

Az *uli3* (UV-B light insensitive) mutáns, amelyet egy *Arabidopsis* T-DNS mutáns screen során azonosítottak, mérsékelt hipokotil növekedés gátlás fenotípust mutatott UV-B sugárzás hatására (Suesslin és Frohnmeier, 2003). A mutánsokra jellemző UV-B választ különösen a 300 és 320 nm közötti régióban figyelték meg. Emellett megfigyelték, hogy a nagy intenzitású UV-B dózis hatására hasonló mennyiség DNS dimer képződött az *uli3* mutánsokban és a vad típusú növényekben egyaránt. Így az *uli3* mutánsok nem érintettek a DNS-repair folyamatában. Az *uli3*, illetve az *uli* mutánsok másik két komplementációs csoportjának tagjai (*uli1* és *uli2*) vad típusú hipokotil növekedés gátlást mutattak vörös, távoli vörös és kék/UV-A fényviszonyok között, amely a mutánsok UV-B jelátvitelben való specifikus részvételét jelzi. Az ULI3 az UV-B által indukált fenilpropanoid útban is pozitív szabályozó elemként szerepel, ugyanis az *uli3* mutánsokban jelentős antocianinszint-csökkenést, és ezzel párhuzamosan redukált CHS expressziót figyelték meg UV-B kezelés hatására (Suesslin és Frohnmeier, 2003). Az ULI3 főként a levelek, a szár és a virágok külső sejtrétegeiben expresszálódik, a gyökérben azonban nem. Az ULI3-GFP fúziós protein petrezselyem protoplasztba történő transzfektálásával megállapították, hogy az ULI3 protein a citoplazmában, a plazmamembránnal határosan helyezkedik el. Ez a 80 kDa ULI fehérje 27%-os homológiát mutat a humán diacylglycerol (DAG) kinázzal, azonban az ULI3-ban nincs konzervált kináz domain (Suesslin és Frohnmeier, 2003). Az ULI3 tehát a fotomorfo-genikus UV-B válaszok genetikailag meghatározott pozitív szabályozója, azonban az UV-B jelátviteli hálózatban elfoglalt helye és szerepe, valamint pontos biokémiai funkciójának meghatározása még hátra van.

Az UV-B jelátvitel egy másik pozitív regulátorát mutáns alléljának (*uvr8-1*) csökkent UV-B toleranciája alapján találták meg *Arabidopsis*-ban. Eddigi megfigyelések alapján az UVR8 (UV-resistance locus) kizárólag az UV-B-hez kötött jelátviteli folyamatokban vesz részt. Szerepet játszik egy sor olyan gén expressziójában, amelyet az UV-B indukál, és amelyek közül soknak fontos szerepe van az UV-B elleni védelemben (Brown és mtsai., 2005). Az *uvr8* mutánsokban nem játszódik le az UV-B által indukált fotomorfo-genézis, ugyanakkor az UVR8 túlzott expressziójának hatására fokozódik az UV-B-re adott válasz. Megfigyelték, hogy a mutáció blokkolja a CHS gén expresszióját és a flavonoid akkumulációt, azaz az UVR8 pozitívan szabályozza az UV-B által indukált fenilpropanoid bioszintézist (Kliebstein és mtsai., 2002, Favory és mtsai., 2009). Bár az UVR8 protein nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a humán

RRC1-gyel (Regulator of chromatin condensation 1), amely a Run GTP-kötő fehérje guanin nukleotid cserélő faktora (Dasso, 2002), azonban funkcionális homológia nincs közöttük (Brown és mtsai., 2005). Kifejlett *Arabidopsis* levélszövetben legalább két, egymástól különböző UV-B jelátviteli folyamat stimulálja a génexpressziót. Ezek az útvonalak különböző szintű UV-B sugárzás hatására aktiválódnak és különböző géncsoportokat szabályoznak. A magas energiaszintű UV-B-re adott jelátviteli folyamat az UVR8-tól független úton stimulálja a gének egy csoportjának expresszióját (Brown and Jenkins, 2008). Számos tanulmányban igazolták, hogy ezek a jelátviteli folyamatok egybefonódnak a sérülés-védekezés jelátviteli folyamataival (A-H-Mackerness és mtsai., 2001; Stratmann, 2003; Brown and Jenkins, 2008). Az UVR8-függő jelátviteli útvonal alacsony energiaszintű UV-B sugárzásnál (is) aktiválódik, és szabályozza az UV-B elleni védekezést.

A növényekben az UV-B kiváltja az UVR8 gyors akkumulációját a sejtmagban. Úgy tűnik, hogy az alacsony energiaszintű UV-B válaszban résztvevő gének expressziójának megváltozásához ez az akkumuláció szükséges, azonban nem elégséges (Kaiserli and Jenkins 2007). További vizsgálatok kimutatták, hogy az UVR8 hisztonfehérjéket köt, valamint *in vivo* kapcsolatba kerül több UV-B által aktivált gén, közöttük a HY5 és HYH kromatin régiójával (Brown és mtsai., 2005, Cloix and Jenkins, 2008). Korábbi tanulmányok arra engednek következtetni, hogy a HYH specifikus lehet a kék fényre adott válaszban, illetve hogy a HYH-nak és a HY5-nek egymással átfedő szerepük lehet a kék és fehér fényre adott válaszban *Arabidopsis*-ban (Holm és mtsai., 2002). Újabb mérések, melyek szerint a HY5 és HYH is stimulálódik már  $0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  szintű UV-B-nél, megerősítik azokat a már korábbi eredményeket, melyek szerint ezeknek a transzkripció faktoroknak kulcsfontosságú szerepük van az alacsony szintű UV-B-re adott válaszfolyamatokban (Jenkins, 2009).

Szemben a látható fény által indukált fotomorfogenezissel, melyben a COP1 negatív regulátorként szerepel, a fotomorfogénikus UV-B válaszban pozitív szabályozóként van jelen. A COP1 UV-B, illetve látható fény jelátvitelben betöltött funkciója jól elkülönül. A SPA (SPA1-SPA4) proteinek a fényválasz fitokróm-specifikus negatív szabályozói. Sötétben és látható fény kondíciók között jelenlétük szükséges a COP1 inaktiválásához, míg az UV-B válaszban a COP1 szerepe független a SPA proteinektől. (Oravecz és mtsai., 2006). Korábbi tanulmányok rámutattak a COP1 aktiváló szerepére a fitokróm B által közvetített válaszreakciókban (Boccalandro és mtsai., 2004), és kimutatták, hogy a COP1-nek nem csak a csíranövények fotomorfogenezisében, hanem például a virágzás szabályozásában és a sztomák nyitásában is szerepe van (Jang és mtsai., 2008). Kiegészítve UV-B fényben a COP1 szükséges a HY5 génexpressziójának aktiválásához, és mindkét protein a sejtmagban lokalizálódik. Úgy tűnik, hogy *Arabidopsis*-ban UV-B hatására a HY5-nek a COP1 által közvetített degradációja gátlódik,

és ezáltal stabilizálódik a HY5 (Favory és mtsai., 2009). A COP1 tehát részt vesz a feltételezett UV-B fotoreceptor által közvetített jelátviteli útban, de az UV-B által indukált stresszválaszokban feltehetően nincs szerepe (Oravecz és mtsai., 2006).

A már korábban említett UVR8 ugyancsak szükséges a HY5 aktivációjához (Brown és mtsai., 2005). A COP1-ben, illetve az UVR8-ban történt mutációk egyaránt blokkolják a HY5 aktivációját, amely jól mutatja az azonos jelátviteli útban való részvételüket. Feltételezhető, hogy az UVR8 függő út vonal összes génjének működését szabályozza a HY5 és HYH, melyek egymással részleges vagy teljes átfedésben működnek, továbbá ezek a transzkripciós faktorok valószínűleg nem játszanak szerepet az UV-B-re választ adó, de UVR8 független jelátviteli folyamatokban (Jenkins és mtsai., 2007). Újabb megfigyelések alapján tudjuk, hogy az UV-B kiváltja az UVR8 és a COP1 fehérjék direkt interakcióját. Ez a kölcsönhatás az UV-B ellen védelmet biztosító jelátviteli rendszer nagyon korai szakaszában szerepel, amely felel a növények UV-B-re adott, összehangolt válaszreakciójáért. Az UVR8 gyors kölcsönhatása a COP1-gyel, gyors UV-B függő felhalmozódása a sejtmagban, és UV-B specifikussága mind olyan tulajdonságok, amelyek emlékeztetnek az ismert fotoreceptorokra. Így nem zárható ki annak lehetősége, hogy az UVR8 esetlegesen UV-B fotoreceptoroként működik (Favory és mtsai., 2009).

### 2.3. NAC transzkripciós faktorok

A NAC proteinek a növény-specifikus transzkripciós faktorok egyik legnagyobb családját alkotják. A NAC mozaikszó a család elsőként leírt három tagjának nevéből származik, melyek név szerint a NAM (NO APICAL MERISTEM), az ATAF1,2 és a CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON 2) (Souer és mtsai., 1996; Aida és mtsai., 1997). A moháktól kezdve, a fenyőféléken át, a zárvatermőkig, tagjai a növényvilágban széles körben előfordulnak, például az *Arabidopsis thaliana* genomja több mint 100 NAC domain-nel rendelkező gént tartalmaz (Riechmann és mtsai., 2000). A NAC proteincsalád olyan különböző növényi fehérjéket foglal magába, melyeket egy erősen konzervált N-terminális NAC domain és egy a hosszát és aminosav szekvenciáját tekintve is igen változatos C-terminális jellemző. A NAC transzkripciós faktorokat először alig több mint egy évtizede írták le (Souer és mtsai., 1996).

A NAC proteinek különböző növényi folyamatok irányításában vesznek részt. Szerepük van egyes fejlődési folyamatokban, köztük a hajtás apikális merisztémájának, a virágzati szervek és az oldalgökök kialakulásában (Souer és mtsai., 1996; Aida és mtsai., 1997; Xie és mtsai., 2000), részt vesznek biotikus és abiotikus stresszválaszokban (Collinge és Boller, 2001; Hegedüs és mtsai., 2003; Tran és mtsai., 2004) növényi hormonszabályozásban (Xie és mtsai., 2000;

Fujita és mtsai., 2004), illetve védekezési folyamatokban egyaránt (Xie és mtsai., 1999; Ren és mtsai., 2000). A mutáns fenotípusok feltűnése jól jelzi a NAC család jelentőségét a növénybiológiában. A legtöbb petúnia (*Petunia x hybrida*) *nam* mutáns esetében hiányzott a hajtás apikális merisztémája és az egyedek még csíranövény korban elpusztultak. Ezekben a mutánsokban előfordult a sziklevek összenövése is. Ha a növényeknek időnként sikerült túlélni ezen az állapoton, a virágzat fejlődésében mutatkozott zavar (Souer és mtsai., 1996). Az elsőként jellemzett NAM gént nem sokkal utána a CUC2 gén leírása követte (Aida és mtsai., 1997). A *cuc1 cuc2* dupla mutánsok fogyatékosai, az összeforrt sziklevek, és az apikális merisztéma hiánya a *nam* fenotípusához hasonló (Aida és mtsai., 1997). A CUC1 gén által kódolt NAC-domain protein nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a CUC2-vel. Egy harmadik *Arabidopsis* NAC gén, a CUC3, mely ugyancsak részt vesz a csúcsmerisztéma és a sziklevek fejlődésében, jól mutatja a funkcionális ismétlődés meglétét (Vroemen és mtsai., 2003). Az *Arabidopsis* NAP (NAC-like, activated by APETALA3/PISTILLATA) génjének expressziója alapvető fontosságú a virágzati szervek sajátosságainak kialakításában (Sablowski és Meyerowitz, 1998). Az *Arabidopsis* NAC1 génje az auxin jelátvitel egyik eleme, az oldalgyökerek képzésében játszik szerepet (Xie és mtsai., 2000; Malamy és Benfey, 1997).

Az *Arabidopsis* TIP (TCV-INTERACTING PROTEIN) a TCV vírus kapszid fehérjéjével kerül speciális kölcsönhatásba, és feltehetően a rezisztencia kialakításában van alapvető szerepe (Ren és mtsai., 2000). A GRAB1 és GRAB2 fehérjék a búza geminivírus RepA fehérjéhez kötődnek (Xie és mtsai., 1999). A paradicsom StNAC génje, illetve az *Arabidopsis* ATAF1 és ATAF2 génjei patogénfertőzés és sebzés hatására, míg a repce BnNAC génje elsősorban rovarkárosítás és gombafertőzés hatására indukálódik (Collinge és Boller, 2001; Hegedüs és mtsai., 2003). Három különböző *Arabidopsis* NAC gén (ANAC019, ANAC055 és ANAC072) túlexpresszálatása fokozott szárazságtoleranciát eredményezett. Továbbá az ANAC072 (RD26) részt vesz egy ABA-függő stressz jelátviteli útban, és indukálódik reaktív oxigénformák hatására is (Fujita és mtsai., 2004). A cukornád SsNAC23 génje erősen indukálódik hideg, víz és rovarkárosítás hatására (Fabio és mtsai., 2005). A NAC családba való besorolás és a stresszválaszokban betöltött feltételezett fiziológiai szerep közötti összefüggés még nem tisztázott, azonban az említett tanulmányok jól rámutatnak a különböző jelátviteli utak közötti kapcsolatokra, illetve átjárhatóságra.

Expressziós vizsgálatok igazolták a NAC gének részvételét a virágzat fejlődésében és reprodukcióban (Hu és mtsai., 2003; Wellmer és mtsai., 2004; Hennig és mtsai., 2004), a hormonválaszokban (Seki és mtsai., 2002; Hoth és mtsai., 2002), biotikus (Schenk és mtsai., 2003) és abiotikus (Seki és mtsai., 2002; Oono és mtsai., 2003; Rabbani és mtsai., 2003) stresszválaszokban. Emellett a NAC gének részt vesznek a fényválaszban (Hayama és mtsai.,



2002; Ulm és mtsai., 2004; Jiao és mtsai., 2003; Vandenabeele és mtsai., 2004), a programozott sejthalálban (Vandenabeele és mtsai., 2004; Gechev és mtsai., 2004), és az öregedési folyamatokban (John és mtsai., 1997; Lin és Wu, 2004).

A NAC transzkripció faktorok összetett szabályozásában szerepet kapnak az mRNS-hasítást eredményező mikroRNS-ek (miRNS), illetve az ubiquitin-függő proteolízis is.

A miRNS-ek olyan rövid RNS-ek, melyek a cél mRNS-hez kapcsolódva, annak poszt-transzkripcionális represszióját eredményezik. Számos NAC gén esetében igazolt a poszt-transzkripcionális irányítás megléte. Például az miR164 szükséges a CUC1 és CUC2 helyes szabályozásához (Mallory és mtsai., 2004; Laufs és mtsai., 2004). A *Cucurbita maxima* (sütőtök) NAC (CmNACP) mRNS-ének floem transzportja az RNS-szint szabályozás egy másik módját mutatja (Ruiz-Medrano és mtsai., 1999). A NAC aktivitását poszt-transzlációs szinten az ubiquitin által közvetített proteindegradáció irányítja. Az E3 ubiquitin-protein-ligáz funkcióval rendelkező SINAT5 a NAC1-gyel kölcsönhatásba kerülve, részt vesz annak proteozomatikus lebontásában, és ezzel gyengíti az auxin jelátvitelt (Xie és mtsai., 2002).

A családot meghatározó N-terminális domain-t NAC domain-nek nevezték el (Aida és mtsai., 1997). A NAC proteinek C-terminálisa meglehetősen változatos. Számos NAC fehérje esetén transzkripcionális aktivációs domain-ként funkcionál (Xie és mtsai., 2000; Ren és mtsai., 2000; Hegedűs és mtsai., 2003; Robertson, 2004; Duval és mtsai., 2002). A NAC proteinek közös általános vonása, a C-terminális régióban nagy gyakoriságban előforduló egyszerű aminosav ismétlődések és a szerinben, treoninban, prolinban és glutaminban gazdag régiók előfordulása (Duval és mtsai., 2002; Kikuchi és mtsai., 2000; Hegedűs és mtsai., 2003).

A DNS és más fehérjék megkötésére egyaránt alkalmas NAC domain strukturális meghatározása betekintést nyújt a proteincsalád molekuláris funkciójába. A NAC domain egy csavart, antiparalel  $\beta$ -lemezből és, az  $\alpha$  körülvevő  $\alpha$ -hélix egységekből áll (Ernst és mtsai., 2004). Szerkezete utal a domain DNS-kötésre, illetve a NAC proteinek dimerizációjában betöltött szerepére. A NAC domain-ek képesek virális fehérjékkel (Xie és mtsai., 1999; Ren és mtsai., 2000) és RING fehérjékkel is kölcsönhatásba lépni (Xie és mtsai., 2002; Greve és mtsai., 2003). Az ANAC NAC domain-je oldatban többnyire dimer formában van jelen (Olsen és mtsai., 2004), melynek kialakításában a konzervált N-terminális blokk  $\beta$ -lemezei között kialakult hidrogénkötések, a konzervált Arg19 és Glu26 által formált sóhidak és számos, ugyancsak a konzervált N-terminális régióban kialakult hidrofób kötés vesz részt (Ernst és mtsai., 2004). A NAC1 és az ANAC proteinek a sejtmagban lokalizálódnak, amely ugyancsak egybevág transzkripcionális faktor szerepükkel (Xie és mtsai., 2000; Greve és mtsai., 2003).

## 2.4. Fényszabályozó elemek

Feltételezhet, hogy a különböző jelátviteli láncok utolsó tagjai úgy fejtik ki hatásukat a célgénre, hogy a célgén promóterén található, meghatározott szekvencia részekhez kapcsolódnak. Ebből kiindulva ezek a regulációs szekvenciák jó kiindulópontjai a promóterhez specifikusan kapcsolódó fehérjefaktorok azonosításának, és ezáltal a jelátvitelben résztvevő további elemek azonosításának. Az eddig szerzett sokrétű ismeret ellenére, keveset tudunk a fény jelátviteli utakban szereplő génekre ható transzkripciós faktorokról és azok kötési helyeiről. A CHS, illetve további, a fenilpropanoid bioszintézis útban résztvevő KALKON FLAVANON IZOMERÁZ (CFI), FLAVANON 3-HIDROXILÁZ (F3H) és a FLAVANOL SZINTÁZ (FLS) gének UV-B és UV-A/kék fény által indukált expressziós változásai, összetett fényszabályozó elemek, LRUs/LREs (light-regulatory units/light-regulatory elements) részvételével történnek. A promóter elemek, amelyek részt vesznek a CHS gén UV-B indukációjában, mustárból és petrezselyemből ismertek (Schulze-Lefert és mtsai., 1989; Kaiser és mtsai., 1995). Ezek a fényszabályozó elemek az *Arabidopsis thaliana*-ban két különböző típusú cisz-regulátor elemet tartalmaznak: a bZIP-kötő ACE (ACGT-containing element) és az MRE (MYB-recognition element) típusú elemeket (Hartmann és mtsai., 1998; Weisshaar és mtsai., 1991; Dröge-Laser és mtsai., 1997; Feldbrügge és mtsai., 1997). Az ACE típusú elemek core szekvenciája: -CACGT-, míg az MRE core szekvenciája: -ACCTA-. Az *Arabidopsis* CHS promóterében azonosítottak egy RRE (R response element) elemet, amely az MRE elemmel együtt részt vesz a CHS gén térbeli kifejeződésének szabályozásában (Hartmann és mtsai., 2005). Míg az MRE<sup>CHS</sup> a MYB12, R2R3-MYB típusú transzkripciós faktor megkötésével fejtik ki hatását (Mehrtens és mtsai., 2005), addig az ACE<sup>CHS</sup> és az RRE<sup>CHS</sup> eddig ismeretlen bZIP illetve bHLH transzkripciós faktorokon keresztül hatnak (Hartmann és mtsai., 2005). Ezeknek a géneknek az UV-B indukciója HY5- és COP1-függő (Oravecz és mtsai., 2006) továbbá a HY5, amely egy bZIP transzkripciós faktor, *in vitro* közvetlenül kötődik a CHS promóter LRU1 promóter elemekhez (Ang és mtsai., 1998). Petrezselyem sejtkultúrával végzett kísérletek mutatták rá, hogy a flavonoid bioszintézis út egy másik résztvevője, az acyl-CoA-oxidáz esetében az UV fény szabályozó elemet két, közel azonos ACE motívum alkotja a megszokott ACE/MRE kombináció helyett. Ugyancsak ez a két elem vesz részt a negatív patogénválaszban. Az UV fény és patogénkezelés hasonló mértékű, és részben ellenkező hatását figyelték meg néhány CPRF, bZIP transzkripciós faktor expressziójában is, és a kísérleti eredmények egyértelműen rámutattak ezeknek a transzkripciós faktoroknak a két jelátviteli út összekapcsolásában betöltött szerepére (Logemann és Hahlbrock, 2002).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált anyagok

##### 3.1.1. Vegyszerek és enzimek

Kísérleteinkhez, ahol azt külön nem jelöltük, a Sigma és Reanal cégektől vásárolt vegyszereket és a Fermentas, Promega és New England Biolabs által gyártott enzimeket használtuk.

##### 3.1.2. Baktériumtörzsek

A molekuláris klónozás során a rekombináns plazmidok felszaporítására az *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  törzset (Hanahan 1983) használtuk. A növényi transzformációhoz GV3101 (pMP90RK) *Agrobacterium tumefaciens* törzset (Koncz és mtsai., 1994), míg az *Agrobacterium* konjugációhoz az *Escherichia coli* S17-1 törzset használtuk fel (Koncz és mtsai., 1994).

##### 3.1.3. Plazmidok és klónok

A szubklónozási lépéseket a pBluescript II KS/SK plazmid vektor felhasználásával végeztük (Sratogene, La Jolla, USA). Az *Arabidopsis* transzformálására a pPCV810 (plant cloning vector) bináris plazmidot (Koncz és mtsai., 1994) használtuk. A vektor tartalmazta az eredeti Ti plazmid T-DNS szakaszából származó jobb és bal oldali határoló szekvenciákat (RB, LB), valamint ezek közé építve a bakteriális replikációs origót (ORI<sub>colEI</sub>), az ampicillin/karbenicillin rezisztenciagént (Amp<sup>R</sup>), és a növényi sejtekben megnyilvánuló konstitutív nopalín-szintáz promóterrel (P<sub>nos</sub>) vezérelt higromicin-foszfotranszferáz (higromicin rezisztenciáért felelős) gént (hpt). Munkánk során felhasznált plazmid vektorokat és az ezek alapján elkészített plazmid klónokat az M1. melléklet 1. és 2. számú táblázatban foglaltuk össze.

##### 3.1.4. Táptalajok

Az *E. coli* bakteriális munkákhoz LB komplett táptalajt (Sambrook et al., 1989), az *Agrobacterium tumefaciens* munkákhoz LB és YEB (Vervliet et al., 1975), a növényanyag nevelése során pedig MS (Murashige és Skoog, 1962), MS Top-Agar (0,5 % agar) táptalajokat használtunk, amelyeket a megfelelő anyagokkal (MgCl<sub>2</sub>, antibiotikumok, X-gal, IPTG)

egészítettük ki. A kísérletekben felhasznált antibiotikumok általunk alkalmazott végkoncentrációját, valamint az organizmusok nevét, amelyek esetében felhasználásra kerültek a 3.1.4. táblázat tartalmazza.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Végkoncentráció</b>	<b>Organizmus</b>
Ampicillin (Amp)	100 g/ml	<i>Esherichia coli</i>
Streptomycin (Sm)	100 g/ml	<i>Esherichia coli</i>
Tetraciklin (Tet)	25 g/ml	<i>Esherichia coli</i>
Karbenicillin (Cb)	100 g/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Rifampicin (Rif)	100 g/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Kanamycin (Km)	25 g/ml	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Higromicin (Hyg)	15 g/ml	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cefotaxim (Cf)	250 g/ml	<i>Arabidopsis thaliana</i>

3.1.4. táblázat. A kísérletekben felhasznált antibiotikumok jegyzéke

### 3.1.5. Növényi anyag és nevelési kondíciók

A kiindulási növényanyag, melyet a transzgénikus növények el állításához és az össz-RNS izolálásához felhasználtunk, a vad típusú *Arabidopsis thaliana Wassilewskija* (Ws) ökotípusa volt. A *cop1-4* (McNellis és mts., 1994b), az *uvr8* (Kliebenstein és mts., 2002), a *cry1cry2* (Mockler és mts., 1999) és *phot1phot2* (Kinoshita és mts., 2001) mutánsok *Columbia* (Col), a *phyAphyB* (Reed és mts., 1994) mutánsok *Landsberg erecta* (Ler) ökotípusban vannak.

#### *A transzformációhoz szükséges növényanyag nevelése*

Az *A. thaliana* növények magvait felhasználásig sötétben, 4°C-on tároltuk. A magvakat COMPO SANA típusú virágföld felszínére vetettük. A gombás fert zések megakadályozására a talajt a vetéssel egy id ben és szükség esetén vegetációban is Fundasol 50WP 0,1%-os oldatával kezeltük. Tavasztól szig terjed id szakban mesterséges megvilágítás alkalmazása nélkül, üvegházban, míg a téli id szakban, fitotronban, hosszúnappalos körülmények (12/12h fény/sötét fotoperiódus, 80% relatív páratartalom és 23±2°C) mellett neveltük a növényanyagot. A transzformációhoz 8-10 hetes korban, virágos állapotban használtuk fel ket.

### *A transzformálásból származó növényanyag kezelése*

A transzformált növényekről származó T1 magok felületét aratást követően sterilizáltuk. Körülbelül 0,1 g magot sterilizáltunk 5% Na-hipoklorit és 0,01% Tween20 oldatában 10-15 percig, háromszor mostuk steril desztillált vízben, majd MS Top-Agar-ban (15 g/ml Hygromycin, 250 g/ml Cefotaxim) felvéve, MS (15 g/ml Hygromycin, 250 g/ml Cefotaxim) táptalajra szélesztettük őket. A T2 magpopulációt, az előzőekben ismertetett módon sterilizáltuk, majd 200-300 l, 0,1%-os agarózban felvéve szelekciós táptalajra (MS, 15 g/ml Hygromycin) helyeztük.

A lemezeket a csírázás elősegítése érdekében két napra 4°C-ra helyeztük, majd a csíráztatás fertőzésmentesen, 23°C-on, hosszúnappalós körülmények (12/12h fény/sötét) között, körülbelül 100 E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitás mellett, növénynevelőkamrában [Versatile Environmental Test Chambers (MLR-350 Sanyo,)] folyt 6 napig. Az UV-B kezelésre a 7. napon került sor.

A vörös fénykezeléshez a növényanyag nevelése módosult. Ehhez a kezeléshez a T2 magok sterilizálás után két napra 4°C-ra kerültek, és a csíráztatás már a mérésre használt 96 lyukas mikrotiter lemezben történt sötétben, 4 napig, 23°C-on. A vörös fénykezelésre az 5. napon került sor.

### **3.2. *Arabidopsis thaliana* transzformáció, transzgenikus növények előállítása**

A transzgenikus *A. thaliana* növényeket *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével, virágzat bemártásos módszerrel állítottuk elő, Clough és Bent (1998) szerint.

A transzformációhoz felhasznált növények akkor a legoptimálisabbak, ha sok virágzatuk és kevés bécstermésük van. Az *A. tumefaciens* törzset, amely hordozza a bináris vektort, karbenicilinnel kiegészített YEB (300 ml) tápoldatban növesztettük 28°C-on 2 napig, majd 500ml folyadékkultúrába (már csak a bináris vektorra szelektív antibiotikumot tartalmazott) átváltva növesztettük további 1-2 napig. Ezután 20 perc, (25°C, 3500 rpm) centrifugálást követően a leülepedett baktériumsejteket 2ml 5% szacharózoldattal óvatosan felszuszpendáltuk, majd folyamatos keverés mellett további 200 ml cukoroldattal hígítottuk. A végzetül 0,01% Silwet L-77-et (Lehle Seeds) és 10 mM MgCl<sub>2</sub>-t tartalmazó baktérium szuszpenzióba a növények virágos részét 2-3 másodpercre bemártottuk. Ezután a növényeket elfektetve, a magas

páratartalom biztosítása érdekében átlátszó fóliával letakartuk 24 órára. A jobb transzformációs hatások elérése érdekében egy hét elteltével megismételtük a folyamatot.

### **3.3. Abiotikus és biotikus stresszkezelések körülményei, és a luciferáz-aktivitás mérése**

UV-B és kvarc kezeléshez a hat napos csíranövényeket egyesével olyan 96 lyukú mikrotiter lemezekbe helyeztük, amelyekbe el z leg lyukanként 200  $\mu$ l MS táptalajt töltöttünk (A gombás fert zések megakadályozására a táptalaj 250  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  koncentrációjú cefotaximot tartalmazott.). A növényekre 20  $\mu$ l, 2 mM D-luciferin (Biosynth) oldatot mértünk, majd a lemezeket átlátszó fed fóliával (TopSeal™ óA:96-Well Microplates, Perkin Elmer) zártuk le. A csíranövényeket további 12-16 óráig neveltük (12/12h fény/sötét), majd 7 napos korban, a világos szakaszban végeztük a fénykezeléseket.

A luciferáz gént hordozó növénykéek kezelésekre hatására bekövetkező lumineszcencia változását TopCount™ (Packard) automata luminométeren mérve követtük. Els lépéseként 2-3 pont leméréssel felvettük az alapvonalat, amely UV-B és kvarc fénykezelés esetében fehér fényben, míg vörös fénykezeléses mérése esetében sötétben folyt. UV-B (25 perc) és kvarc (15 perc) kezeléshez fényforrásként 8 darab Philips TL 40W/12 UV fénycsövet tartalmazó lámpát használtunk, amely 310 nm emissziós maximummal rendelkezik, fényintenzitása 7  $\text{W/m}^2$ . A spektrum megfelelő tartományának kisz réséhez a fényforrás és a mikrotiter lemez közé 3 mm-es vastagságú transzmissziós alulvágó filtert használtunk (WG305, kvarc). A vörös fény kísérletekhez az etiolált csíranövényeket 4 napig 200  $\mu$ l MS táptalajt tartalmazó mikrotiter lemezekben neveltük, 1 napig luciferinben pre-inkubáltuk, majd az 5. napon 20  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  vörös fényvel megvilágítottuk. A vörös kezeléshez (60 perc) 936 db, vörös fényt ( $\lambda_{\text{max}}=660$  nm) emittáló diódából felépülő fényforrást (MIKRO KKT) használtunk. A hormonokhoz kötött, illetve a többi abiotikus stresszválasz kiváltásához a 12L/12D körülmények között nevelt 6 napos csíranövényeket mikrotiter lemezekbe helyeztük, és 1 napig luciferinnel pre-inkubáltuk. Majd a 7. napon, közvetlenül a mérések el tt, hormonkezeléshez 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú ABA (abszcizinsav) (Duchefa) oldatot, sóstresszhez 250 mM NaCl oldatot, ozmotikusstresszhez pedig 100 mM mannitolt mértünk rájuk. A hidegstresszhez a csíranövényeket 6 órára 37°C-ra, míg a hidegstresszhez ugyanilyen időtartamra 4°C-ra helyeztük.

### **3.4. Molekuláris biológiai módszerek**

#### **3.4.1. Plazmid DNS tisztítása**

A bakteriális plazmid DNS-t az ún. alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk (Sambrook et al., 1983). Amennyiben DNS szekvencia meghatározása volt a cél, a QIAPrep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) felhasználásával tisztítottunk plazmid DNS-t.

#### **3.4.2. Növényi DNS tisztítása**

Növenymintáinkból a DNS-t Shure et al., (1983) módszere alapján vontuk ki. A növényi mintákat eppendorf cs ben, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Körülbelül 100 mg növényi szövetet, üveggyöngyök (1,25-1,55 mm, Roth) segítségével, Silamat S5 50 ml malomban homogenizáltunk. A mintákat kétszer 10 másodpercig ráztuk, miközben többször folyékony nitrogénben lehűtöttük. Kivonó puffer (0,6 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,5, 40 mM EDTA, 4% Sacrosyl, 1% SDS) : 10 M urea : 2 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  1:1:0,02 arányú keverékével, majd kétszer 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel 5 perc (5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) centrifugálással extraháltuk és 0,7 térfogat izopropanollal kicsaptuk. A csapadékot visszaoldottuk 300  $\mu\text{l}$  TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) pufferben majd 20  $\mu\text{g}$  RNáz-A-val kezeltük ( $37^{\circ}\text{C}$ , 1h). Ezt követően a DNS-t 1/10-ed térfogatnyi 3 M Na-acetáttal és 2,5 térfogat 96% etanollal ( $-70^{\circ}\text{C}$ , 1h) kicsaptuk, 20 perc, (13 000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) centrifugálást követően a csapadékot 75% etanollal kétszer mostuk, majd beszáritás után 50-100  $\mu\text{l}$  steril desztillált vízben oldottuk és felhasználásig  $620^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### **3.4.3. Southern-analízis**

A DNS mintákat 1,2 %-os agaróz gélben és TBE (90 mM Tris, 90 mM bórsav, 3 mM EDTA) pufferben elektroforézissel elválasztottuk, majd N+ (Amersham) membránra rögzítettük. A hibridizációt Sambrook és mtsai. (1989) szerint végeztük. A radioaktív próbát ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) dCTP beépítésével, random primer módszerrel (Promega: Prime-a Gene kit, Fermentas: HexaLabelTM) készítettük.

#### **3.4.4. Növényi RNS tisztítása**

A növényi mintákat eppendorf cs ben, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd felhasználásig  $680^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Növénytinktől össz-RNS-t a Qiagen RNeasy Plant Mini Kit segítségével vontuk ki a gyártó utasításait követve.

Ehhez körülbelül 100 mg-nyi szövetet homogenizáltunk el a DNS-izolálásnál említett golyós rl malommal. A mintákat kétszer 10 másodpercig rázattuk, miközben többször leh töttük folyékony nitrogénnel. A továbbiakban a gyártó utasításai szerint jártunk el.

Az RNS koncentrációját NanoDrop-ND1000 (NanoDrop Technologies) készülékkel mértük meg.

#### **3.4.5. RNS-analízis**

Northern-analízishez az RNS kivonatokat formaldehidet tartalmazó 1,2 %-os agaróz gélben, 1X-es MAE pufferben ( 0,1 M MOPS [ pH 7,0], 40 mM Na-acetát, 5 mM EDTA) választottuk szét. Az RNS-ek filterre rögzítését és hibridizálását Amasino (1986), valamint Church és Gilbert (1987) szerint végeztük. Az RNS-eket specifikus primerpár segítségével készült (3. táblázat) RT-PCR fragmentum felhasználásával, radioaktív izotóppal jelölt ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) dCTP segítségével, random primer módszerrel (Promega: Prime-a Gene kit, Fermentas: HexaLabelTM ) szintetizált próbával mutattuk ki.

#### **3.4.6. Polimeráz láncreakció, PCR termékek klónozása, szekvenálása**

PCR reakciót általában 50  $\mu\text{l}$  térfogatban, körülbelül 100 ng DNS templát, 10 pmol primer, 10 mM dNTP mix, megfelelő puffer és 1 U *Taq* polimeráz felhasználásával végeztük. A reakció paramétereit az adott primerpárnak (M2. melléklet 3. táblázat) megfelelő en optimalizáltuk.

A kapott termékeket agarózgélen elválasztottuk, amennyiben szekvenacia analízis volt a cél, a kívánt DNS fragmentumot a gélb l izoláltuk a GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) segítségével a gyártó utasításait követve, majd T4 polimerázzal a gyártó utasításai alapján a végeket feltöltöttük, és EcoRV vágott pBluescript II KS/SK klónozó vektorba ligáltuk. A ligátummal *E. coli* DH5- $\alpha$  sejteket transzformáltunk. A vizsgált klónok szekvenciájának meghatározása automata szekvenátor (3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) segítségével történt.



### 3.4.7. Inverz PCR

Az inverz PCR-t Sambrook és Russel (2001) által kifejlesztett módszer szerint végeztük a PCR reakció körülményeinek kisebb módosításával. A felhasznált primereket az M1 melléklet 3. táblázatában tüntettük fel.

Az amplifikáció hőmérsékleti körülményei a következők voltak:

94•C	4 min		
94•C	25 sec	}	4 ciklus
65•C	40 sec		
69•C	7 min		
94•C	25 sec	}	26 ciklus
65•C	40 sec		
69•C	7 min+6 sec/ciklus		
70•C	6 min		
4•C	Ô		

A reakció termékeket 1%-os agaróz gélen, TBE pufferben választottuk el.

### 3.4.8. RT- PCR

A vizsgált növényanyagot MS táptalajon, növénynevelő kamrában neveltük hosszúnappal körülmények között, 10-14 napig. A 25 perces UV-B kezelés után a lemezeket visszahelyeztük a növénynevelő kamrába, majd 60 és 90 perc múlva vettünk mintát RNS tisztításhoz. Kontrollként kezeletlen növényeket alkalmaztunk.

Az expressziós vizsgálathoz az RNS mintákat 10 ng/µl-es koncentrációra hígítottuk, és 1 µl-t adtunk egy 12,5 µl-es reakcióhoz. A reverz transzkripció PCR-hez a OneStep RT - PCR Kitet (Qiagen) használtuk a gyártó utasításait követve. A felhasznált primerpárokat az M1 melléklet 3. táblázata tartalmazza.

Az amplifikáció hőmérsékleti körülményei a következők voltak:

50°C	30 min		
95°C	15 min		
95°C	45 sec	}	4 ciklus
58°C-0.2°C /ciklus	45 sec		
72°C	1 min		
72°C	10 min		
4°C	∞		

A reakciótermékeket 1,8%-os agaróz gélen, TBE pufferben választottuk el.

#### 3.4.9. Irányított pontmutáció létrehozása

A vizsgált promóter szekvenciában irányított pontmutáció létrehozásához a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kitet (Stratagene) használtuk a gyártó útmutatásait követve. A módosítani kívánt DNS fragmentet pBluescript II KS/SK plazmidba klónoztuk, a módosítást tartalmazó oligonukleotid primereket az M1. melléklet 3. számú táblázatában tüntettük fel.

Az amplifikáció paraméterei a következők voltak:

95°C	30 sec		
95°C	30 sec	}	12 ciklus
55°C	1 min		
68°C	3 min		
4°C	∞		

A reakcióterméket 1%-os agarózgélen választottuk el, izoláltuk, klónoztuk, majd *E. coli* DH5- $\alpha$  sejtekbe transzformáltuk. A reakció sikerességét szekvenálással ellenőriztük.

#### 3.4.10. *Agrobacterium tumefaciens* konjugáció

A pPCV bináris növénytranszformációs vektort *E. coli* S17-1 törzs segítségével juttattuk *A. tumefaciens* GV3101 sejtekbe. Az *E. coli* S17-1 sejtek transzformációját Inoue et al., (1990) módszere szerint végeztük.

A donor *E. coli* S17-1/ pPCV-t LB, míg a recipiens *Agrobacterium tumefaciens* -t YEB tápoldatban növesztettük. Mindkettőt 1 egyenlő (200-200 µl) mennyiségeket összekevertünk egy eppendorf csőben, majd ebből a konjugációs mixből 3-4 cseppet YEB szilárd táptalajra cseppentettünk és steril fülke alatt hagytuk őket megszáradni. A lemezeket 28°C-on, 1-2 napig inkubáltuk. Miután a baktériumtelepek felneveltek, átoltottuk őket a megfelelő két antibiotikummal kiegészített YEB szilárd táptalajra, és szelektáltuk a vektort hordozó *Agrobacterium tumefaciens* sejteket.

#### 3.4.11. EMS mutagenézis

A Wassilewskija ökotípusú *Arabidopsis thaliana* ANAC13::Luc transzgénikus növényvonal, önmegtermékenyítésből származó T3 populációját (a továbbiakban M0) használtuk kiindulási anyagként.

Körülbelül 1 g (~50 000 db) magot, vernalizálást (2 nap, 4°C) követően pár órára vízben eláztattuk, majd etilmetán-szulfonát (EMS) 0,2 %-os oldatában gyengén ráztattuk 12 órán át.

Az EMS kezelést követően a magokat bővíz mennyiséggel 12x átmostuk, majd végül nagy mennyiségű vízben felvéve, 800 cserép (8 cm x 8cm) föld felszínére egyenletesen kivetettük. Megközelítőleg 50-100 mag került egy cserépbe.

A csíráztatást és növénynevelést a nyári (hosszúnappalos) időszakban, üvegházban végeztük. A növények beérését követően cserepenként magot fogtunk, és az így kapott M1 magpopulációt vizsgáltuk. A leartott 800 cserép növényt, 800 külön csoportként kezeltük és szortáltak. Csoportonként körülbelül 150-200 magot szélesztettünk ki MS táptalajra. A lemezeket 2 napra 4°C-ra helyeztük, majd a csíráztatás növénynevelés kamrában, hosszúnappalos körülmények között, 23°C-on folyt 6 napig. A csírázás átlagosan 50%-os volt, így csoportonként körülbelül 100 csíranövény luciferáz aktivitását mértük meg. A mérést, a már korábban leírt módon, TopCount™ (Packard) automata luminométerrel végeztük. A csökkent luciferáz aktivitást mutató csíranövényeket felneveltük, róluk magot fogtunk, majd az így kapott M3 magpopulációból származó csíranövényekből RNS-izolálás után szemi-kvantitatív PCR vizsgálatot végeztünk.

## 4. EREDMÉNYEK

Az UV-B sugárzásra adott válaszok elemzésének egy fontos lépése annak vizsgálata, hogy a teljes genom szintjén mely gének expresszióját befolyásolja ez a környezeti inger. Munkánk eredményeként korábban beszámoltak az UV-B kezelésnek kitett, fehér fényben nevelt, 7 napos Wassilewskija (Ws) ökotípusú *Arabidopsis thaliana* csíranövények teljes genom microarray analízisére (Ulm és mtsai., 2004). Ez a vizsgálat számos olyan további kísérlet alapjául szolgált, amelyek célja az alacsony intenzitású, nem károsító UV-B által, *Arabidopsis* csíranövényekben kiváltott válaszreakciók, továbbá az UV-B jelátvitel új komponenseinek azonosítása. A 15 perces, különböző hullámhossz tartományú UV-B kezelések hatására nagyszámú gén expressziójában történt változás. Specifikusan, az alacsony intenzitású UV-B hatására 100 gén mutatott legalább kétszeres indukciót, és 7 gén represszáldott. Megfigyelték, hogy ezeknek a géneknek az expressziója átmeneti jellegű, és közöttük nem meglepő módon, nagy számban szerepelnek transzkripciós szabályozó elemek (Ulm és mtsai., 2004).

### 4.1. Az UV-B által indukált transzkripcionális változások vizsgálata

#### 4.1.1. Magas UV-B indukciót mutató gének expressziós mintázata

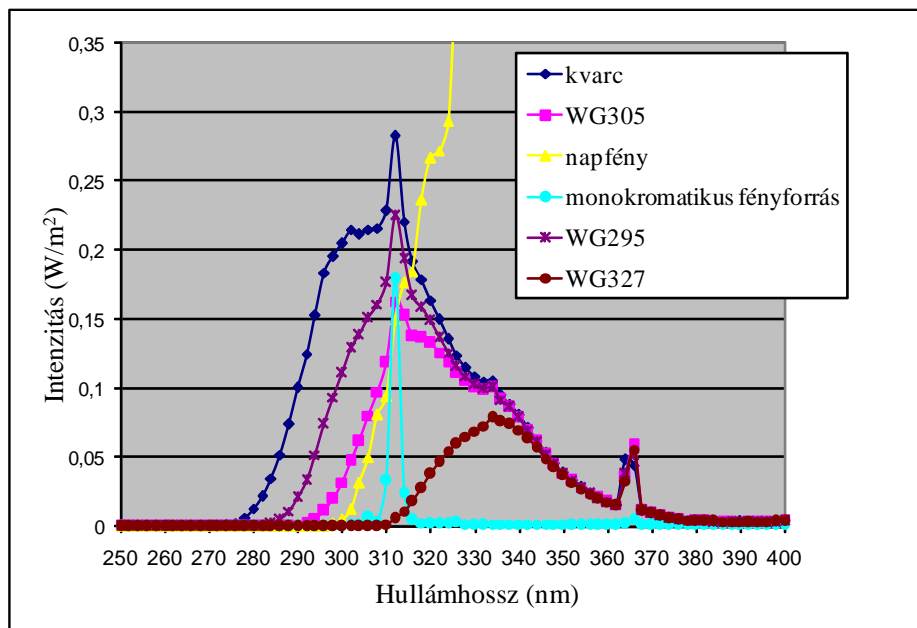
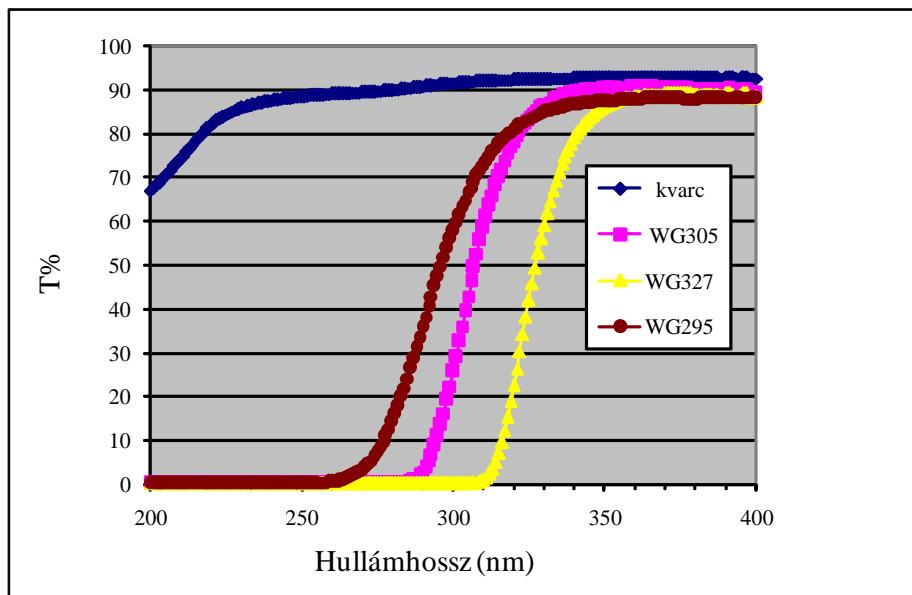
A microarray analízis eredményei alapján az alacsony intenzitású UV-B-re választ adó gének közül kiválasztottuk a 10 legmagasabb indukciót mutató gént (4.1. táblázat). Ahhoz, hogy meghatározzuk, ezen gének UV-B indukált expressziója transzkripciós szinten, avagy mRNS stabilitás szintjén szabályozott, a transzkripciós aktivitás markereként használt luciferáz riportert használtuk fel. Ebben az *in vivo* vizsgálati rendszerben a kiválasztott gének promóter régiójának megközelítőleg 1.5 kb hosszúságú fragmentjét hozzákapcsoltuk a luciferáz (Luc) riportert génhez, majd ezekkel a konstrukciókkal transzformált *Arabidopsis* növényeket vetettük vizsgálat alá. A konstrukciókat tartalmazó növények öntermékenyülésből származó T2 nemzedékét a Szegedi Biológiai Központ Növényi Krono- és Fotobiológiai csoportja bocsátotta rendelkezésünkre. A szegregációs arány alapján meghatározva, a transzgént egy, vagy kevés kópiában tartalmazó, homozigóta növényeket szaporítottuk fel, és T3 generációjukat használtuk a további kísérletekhez. Hogy meghatározzuk a vizsgált gének UV-B indukált expressziójának időbeli változását és az indukció maximális értékét, a következő kísérletet végeztük. A hosszúnappalos körülmények között (12h fehér fény/12h sötét) nevelt, 7 napos transzgenikus növényeket polikromatikus UV-B sugárzásnak tettük ki, majd a luciferáz riportert gén aktivitását

automata luminométeren mértük. Els megközelítésként két különböző UV-B spektrumot vizsgáltunk. A spektrum megfelelő tartományainak kiszéréséhez a polikromatikus fényforrás és a csíranövényeket tartalmazó mikrotiter lemez közé transzmissziós alulvágó filtereket helyeztünk. A WG305 (50%-os transzmissziója 305nm-nél van) alulvágó filterrel egy hosszabb hullámhosszú UV-B spektrumot állítottunk elő, míg a kvarc filter az UV-B spektrum hosszabb és rövidebb hullámhosszú régióját egyaránt átengedi ~280 nm hullámhosszúságig. Utóbbi esetben tehát egy szüretlen UV-B fényérzékeléssel beszélhetünk (1. ábra).

AGI szám	Gén	WG305 indukción mértéke:x (csúcsa)	Kvarc indukción mértéke:x (csúcsa)
At5g11260	<i>HY5</i>	35x (120 min)	8x (150 min)
At4g14690	<i>ELIP2</i>	33x (140 min)	8x (150 min)
At5g52250	WD-40 repeat család	24x (180 min)	4x (180 min)
At1g32870	<i>ANAC13</i>	16x (270 min)	16x (400 min)
At2g36750	<i>UGT72C1</i>	13x (160 min)	19x (240 min)
At4g15480	<i>UGT84A1</i>	11x (140 min)	3x (200 min)
At3g21890	zinc finger (B-box type) család	10x (160 min)	2x (180 min)
At5g59820	<i>ZAT12</i>	7x (180 min)	30x (320 min)
At3g17609	<i>HYH</i>	6x (180 min)	4x (180 min)
At5g05410	<i>DREB2A</i>	5x (180 min)	4x (180 min)

4.1. táblázat. A 10 legmagasabb UV-B indukciót mutató gén

A teljes genomot lefedő microarray analízis (Ulm és mtsai. 2004) alapján kiválasztott 10 gén UV-B indukcióját transzkripciós szinten különböző kinetika és érzékenység jellemzi rövidebb (szüret nélküli, kvarc) és hosszabb (szüret, WG305) hullámhosszú UV-B sugárzás esetén. Feltüntetjük, hogy maximum hányszoros volt az indukció, hogy ennek a szintnek az eléréséhez mennyi időre volt szükség, illetve az AGI számokat és a vizsgált gének neveit.

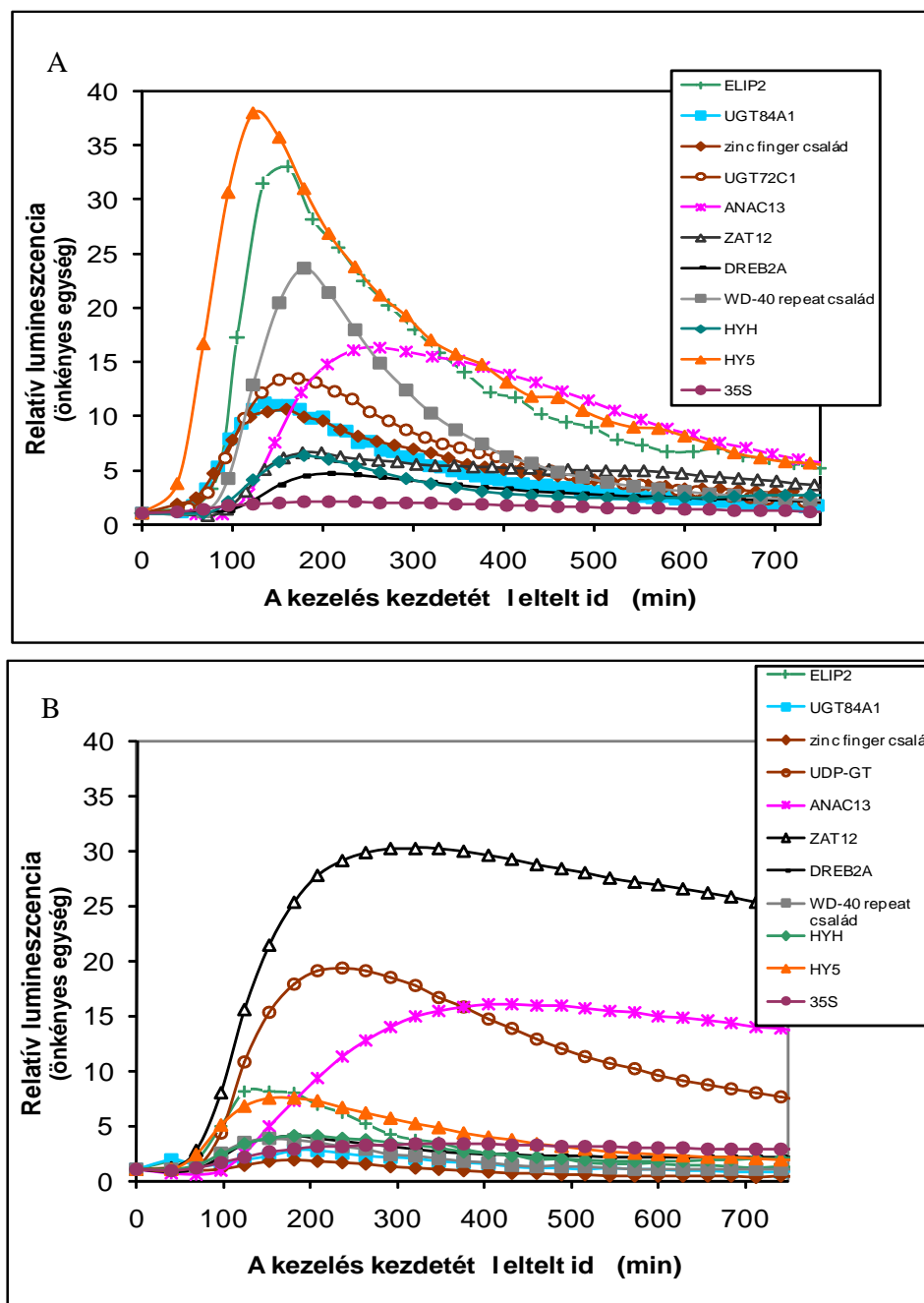


**1. ábra.**

A felső ábra a kísérleteink során felhasznált filterek transzmisszióját (T) mutatja %-os értékben megadva. Az alsó ábrán a felhasznált filterek által meghatározott spektrumokat tüntettük fel az intenzitás és hullámhossz függvényében.

A megvilágítás hossza a nagyobb hullámhosszú kezelés esetében 25, míg a jóval nagyobb intenzitású kvarc esetében 15 perc volt. A vizsgált promóterekhez kapcsolt luciferáz riportergén aktivitását, a besugárzást követően 20 percenként mértük, kb. 500-700 perces időintervallumban. Minden egyes görbe, az izolált T3 vonalak átlagadataiból született. A mérések alapján kitűnik, hogy a nagyobb hullámhosszú UV-B sugárzás gyors expressziós változást indukál a Pro<sub>HY5</sub>,

Pro<sub>ELIP2</sub>, Pro<sub>At5g52250</sub> és a Pro<sub>ANAC13</sub> promóterek esetében, míg a sz retlen UV-B hatására a Pro<sub>ZAT12</sub>, Pro<sub>UGT72C1</sub> és a Pro<sub>ANAC13</sub> promóterek transzkripciós aktivitása növekszik. Felt n , hogy a Pro<sub>ANAC13</sub> közel azonos expressziós mintázatot és szintet mutat a hosszabb hullámhosszú, és a sz retlen UV-B alatt is (2. ábra).



2. ábra.

(A) 10 kiválasztott gén promóteréhez kapcsolt luciferáz expressziós mintázata hosszabb hullámhosszú (WG305) és (B) sz retlen (kvarc) UV-B kezelés hatására. Kontrollként a CaMV 35S promóterét használtuk.

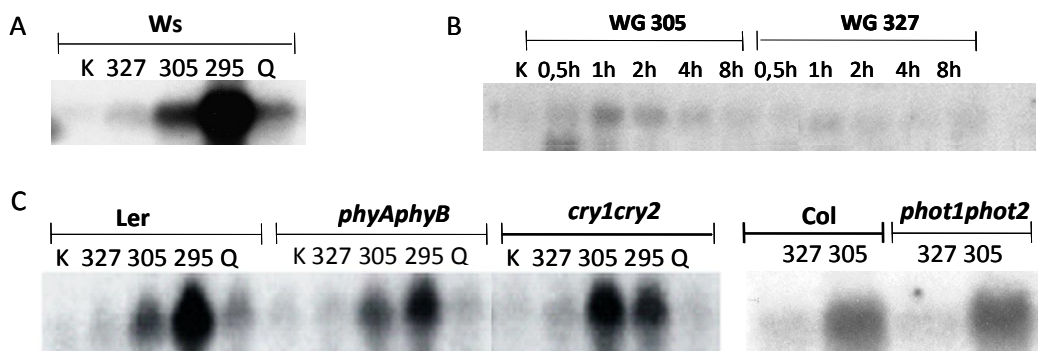
A relatív lumineszcencia a kiindulási szintekhez képest relatív értékeket jelent, tehát azt mutatja, hogy az UV-B kezelést megelőzően felvett alapvonalhoz képest, hányszorosára növekedett a luciferáz aktivitása.

#### 4.1.2. Az ANAC13 gén korai UV-B válaszáinak spektrális függése

A kirajzolódó expressziós mintázata alapján (2. ábra) a tíz kiválasztott UV-B választ adó gén közül az ANAC13-mal végeztünk további kísérleteket. Az ANAC13 egyrészt az átlagosnál magasabb UV-B indukciót mutatott, illetve felkeltette érdeklődésünket, hogy mindkét vizsgált spektrum esetében szinte azonos mértékű indukciót mérünk. A kiválasztásnál az is szerepet játszott, hogy egy új elemet vizsgáljunk. A microarray kísérlethez származó adatok megértésére, illetve további jellemzés céljából, az eredetiekkel azonos körülmények között megismételtük az UV-B kezeléseket *Ws* ökotípusú *Arabidopsis* növényeken. A csíranövényeket 7 napos korrig növénynevelő kamrában neveltük hosszúnappal körülmények között. Az UV kezelés során, csökken a transzmissziós tulajdonságú alulvágó filterek felhasználásával, négy különböző UV spektrumot állítottunk elő: WG327 (negatív UV-B kontroll, túlnyomóan UV-A), WG305 (alacsony energiaszintű UV-B), WG295 (erősebb UV-B) és kvarc (szüretlen, erős UV-B). Meg kell jegyeznünk, hogy a WG327-es alulvágó filter alatti UV-B kezelés a legtöbb UV-B által indukált gén kismértékű indukcióját eredményezheti, mivel ez a filter kis mértékben átengedi a 310-320 nm hullámhosszúság közötti UV-B sugárzást. A besugárzást követően a növényeket visszahelyeztük a nevelési körülmények közé. Egy órával a kezelés kezdetét követően mintát szedtünk. A WG327-es negatív UV-B kontroll mellett volt egy másik, kezeletlen kontrollunk is, amelyet a mintaszedésig a nevelő kamrában tartottunk.

A mintákból Northern-analízishez teljes RNS-t izoláltunk, specifikus próbaként az ANAC13 gén kódoló régiójára tervezett ANAC13\_for és ANAC13\_rew primerek (M1. melléklet 3. táblázat) segítségével amplifikált fragmentumot használtuk. A Northern-analízis (3. A ábra) az ANAC13 gén expressziós változásait mutatja a különböző UV spektrumok esetében. Látható, hogy a transzkriptum felhalmozódása a WG305, WG295 és kvarc-kezeléseknél magasabb, mint a két negatív kontroll esetében. A WG295 esetében erősebb, míg a WG305 és a kvarc-kezelésnél gyengébb jelet kaptunk.





**3. ábra.**

A 3. ábra A része az ANAC13 UV-B által indukált expresszióját mutatja négy különböző spektrum esetében, 1 órával a kezelés kezdetét követően (Ws ökotípus). Az ábra B része az ANAC13 gén alacsony szintű UV-B által kiváltott expressziós kinetikáját mutatja WG305 és a negatív kontrollként használt WG327 filterek alatt. A K minden esetben a kezeletlen kontrollt jelöli. A C ábrarészen vad típusú (Ler és Col ökotípusú) és fotoreceptor duplamutáns csíranövények ANAC13 génjének UV indukálhatóságát mutatja a négy, illetve két különböző tartományban.

#### **4.1.3. Az ANAC13 gén UV-B indukciója gyors és tranziens**

Ahhoz, hogy információt kapjunk az UV-B által indukált ANAC13 mRNS szintjének változásáról az idő függvényében, a felhalmozódott transzkriptum szintjét 8 órás idő intervallumban vizsgáltuk. A hétnapos Ws csíranövényeket WG327 és WG305-ös alulvágó filterek felhasználásával, a fentiekkel megegyező módon kezeltük UV-B-vel. A kezelést követően a növényeket visszahelyeztük a nevelési kondíciók közé, majd 0,5-, 1-, 2-, 4-, és 8 órával a kezelés kezdetét követően mintát szedtünk teljes RNS kivonáshoz. A mintákat Northern analízissel vizsgáltuk a fent leírtakkal azonos módon. A 3. B ábra az UV-B kezelt ANAC13 gén indukációs kinetikáját mutatja. Az időbeli felosztás jelzi, hogy az ANAC13 gén UV-B válasza gyors és tranziens, a transzkriptum szintje megközelíti leg 1h-nál éri el maximumát, majd fokozatosan lecsökken.

#### **4.1.4. Az ANAC13 transzkripcionális szint UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól**

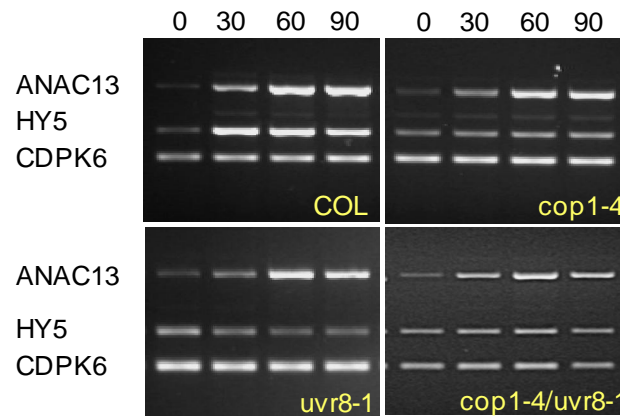
Jól ismert, hogy a látható fény által, a fotoreceptorokon keresztül közvetített folyamatok számos, sokrétű szabályozó hálózatot befolyásolnak. Megvizsgáltuk, vajon az ANAC13 transzkripcionális szintű UV-B válaszában szerepet játszanak-e a már ismert fotoreceptorok. A kísérletben a fitokróm A és B (*phyAphyB*), a kriptokróm 1 és 2 (*cry1cry2*) és a fototropin 1 és 2

(*phot1phot2*) kettős mutánsok ANAC13 génjének UV-B indukálhatóságát vetettük össze a vad típusú növény azonos génjének viselkedésével. A 7 napos csíranövényeket 15 percig kezeltük az UV fényforrás különböző (WG327, WG305, WG295, kvarc) tartományaival. A mintákat egy órával a kezelés kezdetét követően szedtük le, melyekből a fent leírtakkal azonos módon totál RNS-t vontunk ki és Northern-analízist végeztünk. A 3. C ábrán látható, hogy a fitokróm és fototropin fotoreceptor kettős mutáns a vad típusú növényekkel azonos UV-B választ mutat az összes vizsgált tartomány esetében. Azonban a kriptokróm dupla mutáns esetében az eddig megfigyelhető expresszió aránya a hosszabb és rövidebb hullámhosszú UV-B kezelés esetében eltolódott a hosszabb hullámhossz irányába.

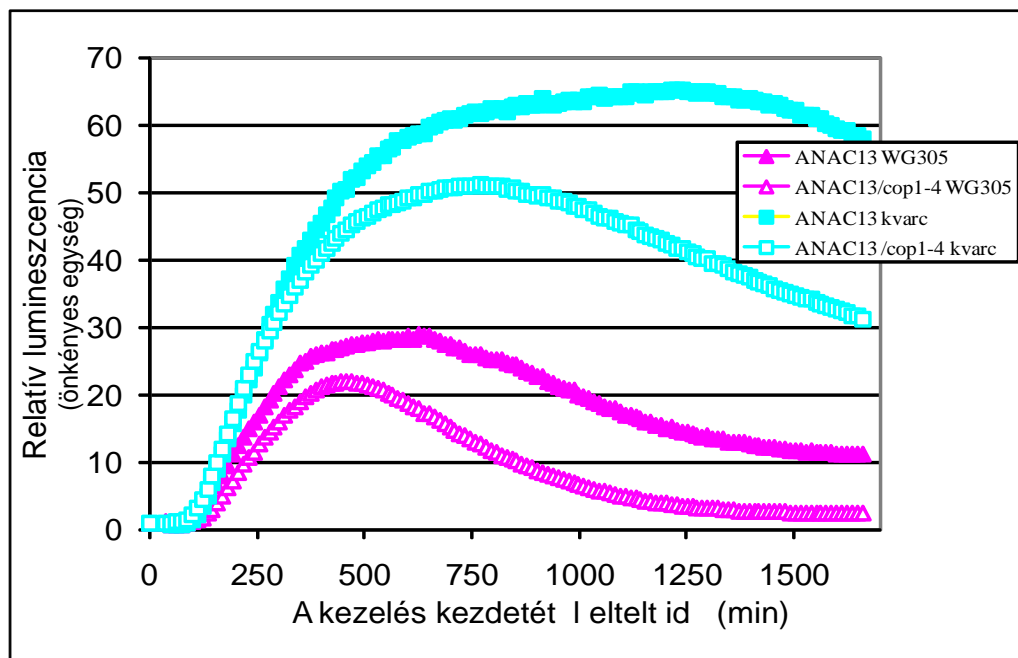
#### 4.1.5. Az ANAC13 UV-B jelátvitelben elfoglalt pozíciója

Korábbi kísérletek arra utalnak, hogy a COP1, illetve az UVR8 fehérjében történt mutációk egyaránt blokkolják a HY5 gén indukcióját az UV-B válaszban, amely jelzi az azonos jelátviteli útban való részvételüket (Ang és mtsai., 1998, Brown és Jenkins, 2008). Felmerül a kérdés, vajon az általunk kiválasztott ANAC13 gén a COP1, UVR8 és HY5 által meghatározott jelátviteli út egyik eleme, vagy más szignalizációs kaszkád által szabályozott? A hétnapos, UV-B-vel (WG305, Kvarc) kezelt csíranövényekből a kezelés kezdetétől eltelt 30-, 60-, és 90 perc múlva mintát szedtünk, és totál RNS-t izoláltunk. Szemi-quantitatív RT-PCR vizsgálatot végeztünk, melyben összehasonlítottuk az endogén ANAC13 expressziós mintázatát UV-B-vel kezelt vad típusú növényekben, és különböző mutáns hátterekben (4. ábra). A génspecifikus primerek (LUCfor, LUCrev, ANAC13\_for, ANAC13\_rev, HY5\_for, HY5\_rev és a kontrollként használt CDPK6\_for és CDPK6\_rev) adatait az M1 melléklet 3. táblázata tartalmazza. A 4. A. ábrán jól látható, hogy az ANAC13 UV-B indukciója nem érintett jelentős mértékben a *cop1-4* mutánsban, szemben a HY5 szigorúan kisimuló indukciójával. Emellett az ANAC13 UV-B válasza ugyancsak kevésbé érintett az *uvr8-1* és *cop1-4/1* kettős mutánsban, a vad típusú (Col) összehasonlítva.

A



B



4. ábra.

(A) Szemikvantitatív RT-PCR analízis, amely az ANAC13 és HY5 UV-B által indukált mRNS szint változását mutatja *cop1-4*, *uvr8-1*, és *cop1-4/uvr8-1* genetikai háttérben a vad típusal (COL) összevetve. (B) A Pro<sub>ANAC13</sub> UV-B indukciója vad típusban és *cop1-4* genetikai háttérben, WG305 és kvarc filter alatt.

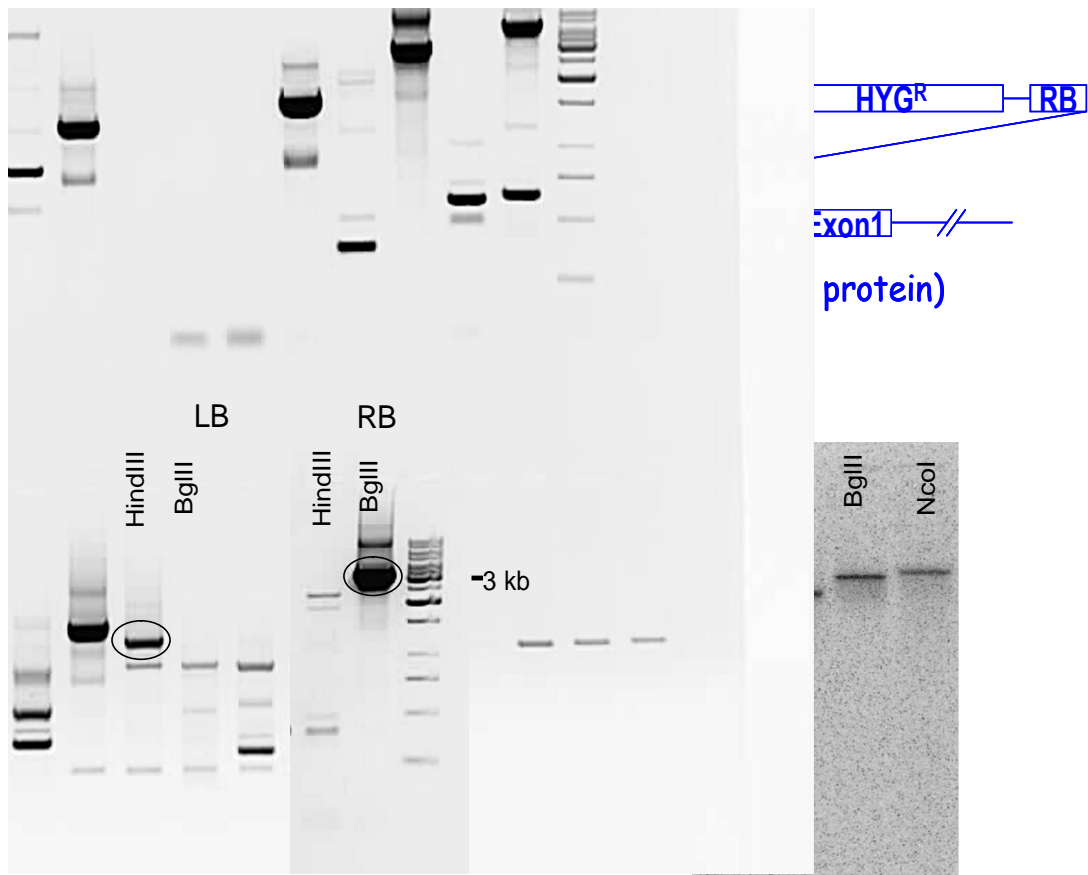
Hasonlóan az endogén ANAC13 mRNS szinten tapasztalt UV-B válaszához, a Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc riporter konstrukció UV-B indukciója is csak kismértékű csökkenést mutat a *cop1-4* háttérben a vad típushoz képest WG305 és kvarc filter alatt (4.B ábra).

## **4.2. A Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc riporter konstrukció jellemzése**

### **4.2.1. A transzgén beépülésének meghatározása**

Vizsgálataink célja az volt, hogy az UV-B sugárzás érzékelésében, és az ehhez kapcsolódó jelátviteli rendszerben újabb molekuláris elemeket azonosítsunk. Kísérleteink során elvégeztük az ANAC13 gén promóterének funkcionális analízisét az UV-B által szabályozott cisz-elemek azonosítása érdekében, melyek jó kiindulópontot jelenthetnek a promóterhez specifikusan kapcsolódó fehérjefaktorok azonosításához, és ezzel a jelátvitelben résztvevő további elemek felderítéséhez.

A Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc riporter konstrukciót tartalmazó *Arabidopsis* növényekből 120 független inszerciós vonalat (ANAC13#1-20) vizsgáltunk meg. A T2 populáció hétnapos csíranövényeinek UV-B indukcióját CCD kamera segítségével vizsgáltuk. Azokkal a vonalakkal dolgoztunk tovább, amelyeknél mérhető kifejeződést kaptunk. A későbbi kísérletek szempontjából megfelelő vonal kiválasztásához Southern-hibridizációval határoztuk meg az egyszeres inszerciót tartalmazó vonalakat. A genomi DNS-t HindIII, BglII és NcoI restrikciós endonukleázokkal emésztettük. Az RB próbát RBfor1 RBrev1 primerpár segítségével készítettük (M1. melléklet 3. táblázat). A 4. ábra a további kísérletekben felhasznált, egyszeres inszerciót tartalmazó ANAC13#14 vonal Southern-analízis gélképét mutatja.



5. ábra.

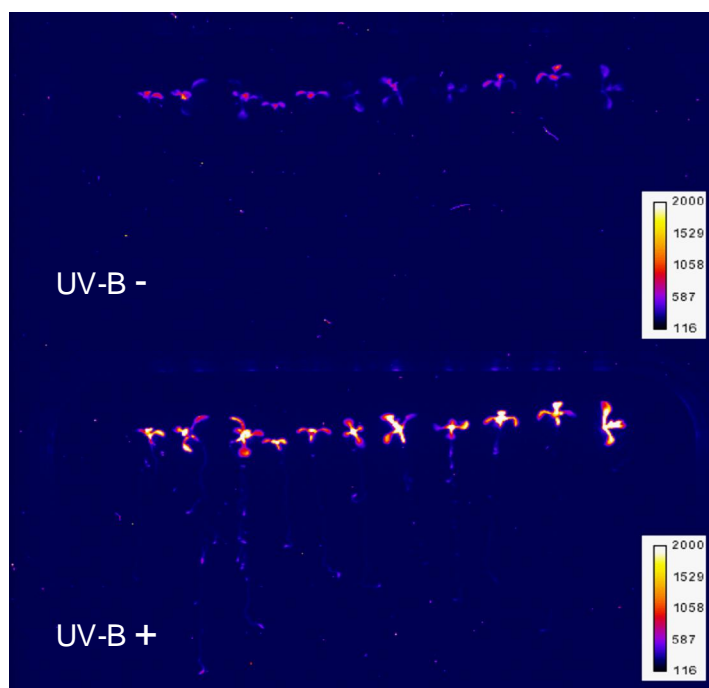
(A) Az ANAC13#14 inszerciós vonalban a transzgén felépítésének és beépülésének sematikus ábrázolása. (B) A jobb-, (RB) és baloldali (LB) határoló szekvenciák meghatározásához készült inverz PCR eredménye. A bekarikázott fragmentumok szekvenálását követ en tudtuk meghatározni a beépülés pontos helyét. (C) A transzgén egyszeres beépülését igazoló Southern analízis gélképe.

Inverz PCR technika felhasználásával megvizsgáltuk, a növény genomján belül melyik részre épült be a transzgén. A genomi DNS-t HindIII, illetve BglIII restrikciós endonukleázokkal emésztettük meg. A ligálást követ en a PCR reakcióban a jobboldali határoló szekvencia meghatározásához a HygILA-up1 és LucplusINV primereket, míg a baloldali határoló szekvenciák meghatározásához az LB21 és PBR1 primereket használtuk. A megfelelő méret és specifikus PCR fragmenteket (5. B ábra) gélben izoláltuk, *pBluescript II KS/SK* vektorba, *EcoRV* helyre klónoztuk és szekvenciájukat T3, T7 primerek felhasználásával határoztuk meg (M1 melléklet 3. táblázat). A szekvencia azonosítását BLAST programmal és a TAIR adatbázis alapján végeztük, mely alapján a T-DNS az 1-es kromoszómán, az At1g33050 számmal jelzett gén, 5. A ábrán feltüntetett régiójába épült be. A szomszédos genomi szakaszokra tervezett primerek (ANAC13#14for, ANAC13#14rew), illetve a fent említett transzgén-specifikus (LB és

RB határoló szekvenciákra tervezett) primereket felhasználó PCR technika segítségével igazoltuk, hogy a T-DNS az ábrán jelzett (5. A ábra) irányban épült be.

#### 4.2.2. A transzgén kifejezésének szövetspecifikussága az ANAC13#14 inszerciós vonalban

A  $Pro_{ANAC13}::Luc$  riporter konstrukció szöveti kifejezését a transzgént tartalmazó, T3 *Arabidopsis* csíranövényeken vizsgáltuk CCD kamera alatt. A 6. ábrán 45 perces expozíciós idő elteltével látható a gyökeres csíranövények biolumineszcenciája UV-B kezelés előtt, illetve azt követően. A gyökérben és a zöld növényi részekben közel azonos mértékű indukciót figyelhetünk meg a 25 perces UV-B (WG305) kezelés hatására.



6. ábra

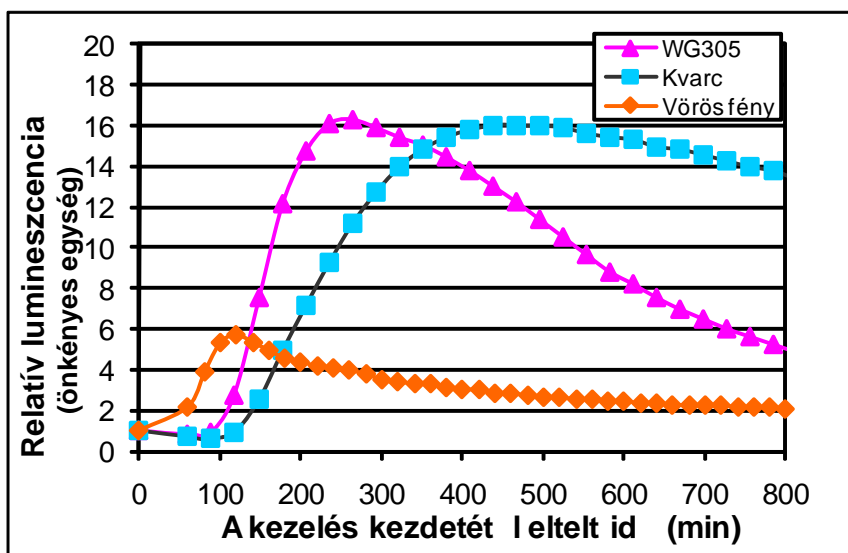
A  $Pro_{ANAC13}::Luc$  transzgén szöveti kifejezése *Arabidopsis* csíranövényekben. A felső kép az UV-B kezelést megelőző állapotot, míg az alsó kép a kezelést követő állapotot mutatja.

### 4.3. Az ANAC13 fényválasza

#### 4.3.1. Az ANAC 13 aktiválódik vörös fény kezelésre

Az UV-B mellett, a vörös fény is indukálja az ANAC13 expresszióját. Az etiolált csíranövények 60 perces vörös fény kezelését követően a  $Pro_{ANAC13}$  expressziója kb. 6x-ra

indukálódott (7. ábra). A vörös fény indukció valamivel gyorsabban éri el maximumát, azonban lényegesen alacsonyabb szintet mutat a közel azonos indukciót mutató hosszabb hullámhosszú, illetve sz retlen UV-B válasszal összevetve.



7. ábra

Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc expressziós mintázatának összehasonlítása, vörös fény és hosszú hullámhosszú, illetve sz retlen UV-B hatására.

#### 4.3.2. Az ANAC13 UV-B és vörös fény válasza részben különböző cisz-elemek részvételével szabályozott

Az ANAC13 expressziója, hasonlóan a CHS expressziójához, UV-B és vörös fény által is szabályozott. A CHS és még néhány, a fenilpropanoid bioszintézis útban résztvevő gén (CFI, F3H, FLS) promóterének szekvenciáját (Hartmann és mtsai., 2005) összevetettük az ANAC13 promóterének szekvenciájával (8. ábra).

#### ACE-boxes

<i>CHS</i>	ACAAC TAGAC <u>ACGT</u> AGATCTTCAT
<i>CFI</i>	ACGAAAGTAC <u>ACGT</u> GCTTACACAT
<i>F3H</i>	ATAGAAAGCC <u>ACGT</u> CTTAAAAATG
<i>FLS</i>	AGATTTGCC <u>ACGT</u> CCTCACTTCC
<i>ANAC13</i>	CAAAGATGCT <u>ACGT</u> GTCGTCTCTG

#### MRE-boxes

<i>CHS</i>	CCGTCCATCT <u>AACCT</u> ACCACACTC
<i>CFI</i>	AACTATTGCT <u>ACCTA</u> CCCTTCTCT
<i>F3H</i>	GTCGCTAGCT <u>ACCTA</u> CCACGGACT
<i>FLS</i>	GGATAGAGAC <u>ACTA</u> ACCACATAAA
<i>ANAC13</i>	CTGTAAGCCA <u>AACCT</u> TCTTCTCCA

### 8. ábra

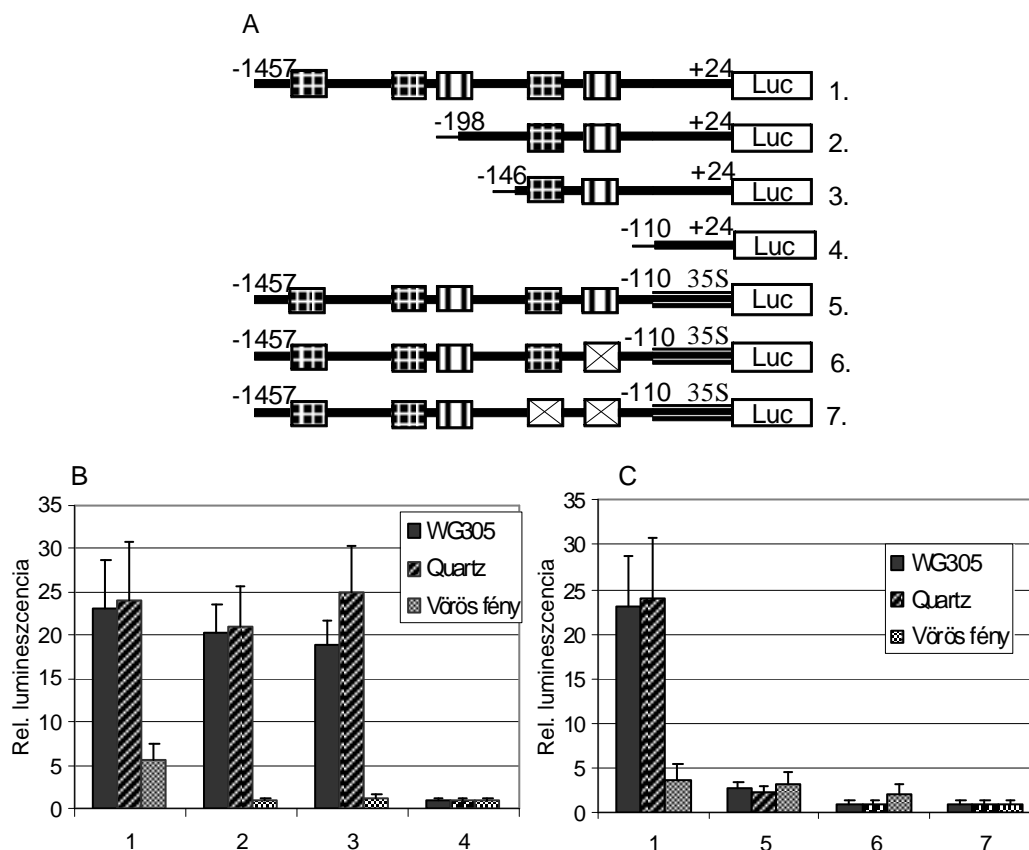
Az ANAC13 promóter régiójában azonosított, feltételezett ACE és MRE típusú elemek szekvenciájának összehasonlítása a fenilpropanoid bioszintézisben résztvevő gének ACE és MRE elemeinek bázissorrendjével.

Mindegyikükben el fordul legalább egy ACE<sup>CHS</sup> és egy MRE<sup>CHS</sup> elem (8. ábra), melyek párban helyezkednek el. Az általunk vizsgált promóter két MRE<sup>CHS</sup> és három ACE<sup>CHS</sup> típusú elemet tartalmaz, közülük négy, párban helyezkedik el (9. ábra).

Ahhoz, hogy meghatározzuk a feltételezett cisz-elemek funkcióját, illetve hogy kiderítsük, hogy az ANAC13 UV-B és vörös fény indukciója egymástól független, vagy azonos szabályozó elemeken keresztül valósul meg, különböző ANAC13 promóter mutánsok expressziós mintázatát vizsgáltuk meg *Arabidopsis* csíranövényekben. Az elkészített kiméra géneket a 9. ábra szemlélteti. A 9. B ábrán látható, hogy a promóter -1457 és -198 közötti szakaszának eltávolítása (9. ábra A/2. konstrukció) nem okozott jelentős változást sem a hosszabb hullámhosszú, sem a szűrt UV-B indukcióban, azonban a vörös fény általi indukálhatóság megszűnt. Továbbá meg kell említenünk, hogy ennek a szakasznak az eltávolításával az alapindukció nagyságrendileg a tizedére csökkent, ez azonban a relatív értékek ábrázolása miatt az ábráról nem olvasható le. A -1457 és -146 közötti szakasz eltávolítása sem hozott számottevő változást az UV-B válaszban (9. ábra A/3. konstrukció). Ezzel szemben, a közeli promóter régió feltételezett ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemeinek eltávolítása (9. ábra A/4. konstrukció) már drasztikus hatással volt az UV-B indukcióra is. Ennek a rövid (-110-tól +24-ig) konstrukciónak



az expresszióját, hasonlóan a CaMV35S minimál promóterhez (-46-tól +6-ig) (Benfey és mtsai., 1990), az UV-B nem befolyásolja.



**9. ábra**

(A) Az ANAC13 gén promóterének és a luciferáz riporter gén fúziójával létrehozott kiméra gének sematikus ábrázolása. Fekete vonal: ANAC13 promóter régió, négyzettrácsos téglalap: feltételezett ACE<sup>ANAC13</sup> elem, függőlegesen vonalkázott téglalap: feltételezett MRE<sup>ANAC13</sup> elem, 35S: CaMV minimál promóter, Luc: luciferáz riporter. (B) A fent jelzett 1-4 számú kiméra gének UV-B, kvarc és vörös fény által kiváltott maximális indukciója relatív értékben megadva. (C) A fent jelzett 5-7 számú kiméra gének UV-B, Kvarc és vörös fény által kiváltott maximális indukciója relatív értékben megadva.

Abban az esetben, amikor a rövid -110-től +24-ig terjedő promóter szakaszt a CaMV35S minimál promóterrel helyettesítettük (9. ábra A/5. konstrukció), az UV indukciója jelentősen lecsökkent, mértéke a tizedére (~2,5x) esett vissza. Ezzel szemben a vörös fény válasz szintje csak kis mértékben csökkent (~4-5x) (8. ábra C). A feltételezett MRE<sup>ANAC13</sup> elem szekvenciájának célzott mutációja (10. ábra) teljesen megszünteti a konstrukció UV-B választ, míg a vörös fény indukció a harmadára csökken (9. ábra A/6. konstrukció). Amikor a

feltételezett ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemeket egyszerre rontottuk el (10. ábra) a vörös fény válasz is teljesen megszűnt (9. ábra A/7. konstrukció).

ACE	vad típus mutáns	gctACGTgct gctCCTGgct
MRE	vad típus mutáns	aagCCAAACCTtct aagTGCGCTAGtct

## 10. ábra

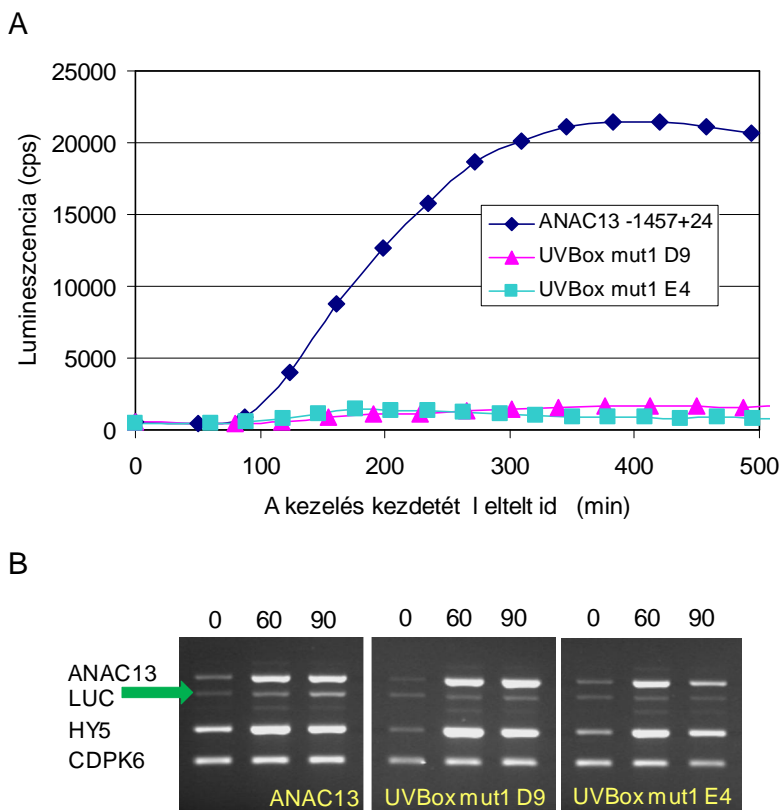
A feltételezett ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemek szekvenciájában történt célt mutációk.

### 4.4. Feltételezett UVBox azonosítása és jellemzése

#### 4.4.1. Pontmutációk azonosítása luciferáz alapú genetikai szűrés során

Az UV-B-függő jelátviteli kaszkád elemeinek azonosítására elindítottunk egy luciferáz alapú genetikai szűrés vizsgálatot *Arabidopsisban*. E célból a Pro<sup>ANAC13</sup>::Luc transzsgént egyszeres kópiában tartalmazó homozigóta transzgenikus növényvonalakat neveltünk föl, melyeknek T3 magpopulációját (a továbbiakban M1) használtuk kiindulási anyagnak. Az M1 magpopulációt EMS (etil-metán-szulfonát) kezeléssel mutagenizáltuk. A szűréshez a mutáns csíranövényeket 7 napig hosszúnappalos körülmények között (12h fény/12h sötét) neveltük, majd hosszabb hullámhosszú UV-B sugárzásnak (WG305) tettük ki 25 perces időtartamra. A kezelést követően automata luminométer segítségével megmértük a luciferáz riporter aktivitását és izoláltuk azokat a mutációkat, amelyek a vad típustól eltérő UV-B választ mutattak. A kiválasztott csíranövényeket felnevelve, a belső származó M3 generáció UV-B általi indukálhatóságát újra teszteltük. Abban az esetben, ha a növényvonal továbbra is csökkent UV-B választ mutatott, részletes vizsgálat alá vetettük. Első megközelítésként ezeken a vonalakon szemikvantitatív RT-PCR vizsgálatot végeztünk az endogén ANAC13, HY5, a belső konstitutív kontrollként használt CDPK6 és a luciferáz (Luc) gének expressziós változásainak nyomon követésére (11. ábra). A reakcióhoz használt LUC\_for, LUC\_rev, ANAC13\_for, ANAC13\_rev, HY5\_for, HY5\_rev, CDPK6\_for, CDPK6\_rev génspecifikus primerek adatait az M1. melléklet 3. táblázata tartalmazza. Mind a 14 megvizsgált vonal esetében az endogén gének mRNS felhalmozódása vad típusú volt. Két, egymástól független mutáns esetében, melyeket UVBox mut1 D9 és

UVBox mut1 E4 névvel láttunk el, a Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc transzgén expressziója változatlan maradt, szemben a vad típusnál tapasztalt indukcióval, melyet a 11. B ábrán a zöld nyíl jelöl.



**11. ábra**

Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc genetikai screen során azonosított promóter mutánsok jellemzése. (A) A két azonosított promóter mutáns vonal (UVBox mut1 D9 és E4), illetve a szül i vonal (ANAC13 -1457-t l +24-ig) lumineszcenciájának összehasonlítása WG305 filter alatt.

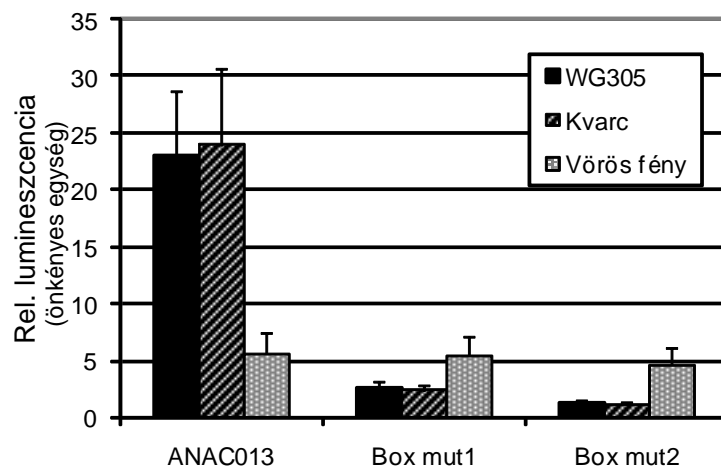
(B) Szemi-quantitatív RT-PCR a vad típusú ANAC13 és a két promóter mutáns vonalban (D9, E4).

A mutációk természetének meghatározásához mindkét esetben DNS-t izoláltunk, majd LUCseq és LBseq primerek felhasználásával PCR-t készítettünk. Az ennek eredményeként kapott PCR termékeket *pBluescript II KS/SK* vektorba, *EcoRV* helyre klónoztuk és szekvenciájukat T3, T7 primerek felhasználásával határoztuk meg. A szekvencia adatok azt mutatták, hogy mindkét mutáns egy pontmutációt hordoz, még hozzá a promóter közeli régiójának ugyanazon pozíciójában (-110), ahol az eredeti citozin timinre cserél dött.

A

$ACE^{ANAC013}$   $MRE^{ANAC013}$   $UVBox^{ANAC013}$   
 tgct acgt gtcgtctctgtaagcca aacct tcttctt ccaagg gaaaaaacaccaattaaa  
 ttaa atgaaaaataaaatatttccgcagaataagactcttcttccatttgggtacagaaa  
 aatcga aactttttagggtttttttttttgtgataacgagagagaaaaagtgATG

B



12. ábra.

A feltételezett  $UVBox^{ANAC13}$ . (A) Az ANAC13 promóter -147-+24 régiójának szekvenciája az  $ACE^{ANAC13}$ ,  $MRE^{ANAC13}$  és a feltételezett  $UVBox^{ANAC13}$  szabályozó elemek feltüntetésével. Az 1 és 2 számokkal jelzett, vastagon kiemelt nukleotidok a két pontmutációt jelzik, a d ltbet s rész pedig a nem transzlálódó szakaszt jelöli. (B) A teljes hosszúságú (-1457-t l +24-ig) ANAC13 promóter és a feltételezett  $UVBox^{ANAC13}$  elemekben található pontmutációkat (mut1, mut2) hordozó teljes hosszúságú promóter fragmentek UV-B és vörös fény indukciójának összehasonlítása.

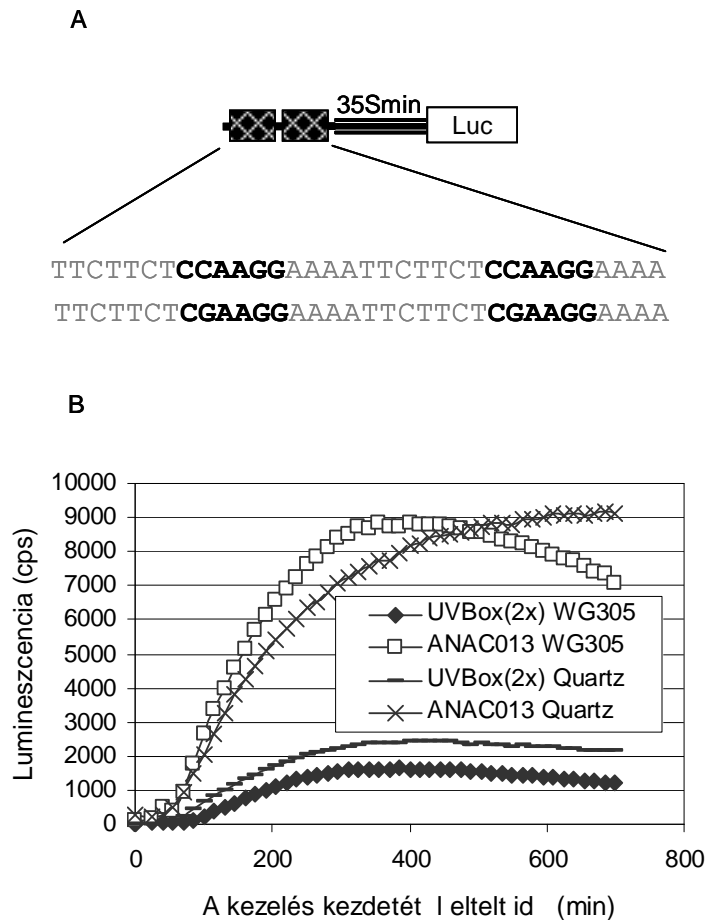
Hogy bizonyítsuk, hogy a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  mutáns vonalak csökkent UV-B indukcióját valóban ez az egy pontmutáció okozta, újra generáltuk a vad típusú -1457-t l +24-ig terjed  $Pro_{ANAC13}::Luc$  konstrukcióban. Egy, a kívánt nukleotid cserét tartalmazó oligonukleotid felhasználásával hoztuk létre az irányított pontmutációt (a primer adatait az M1. melléklet 3. táblázata tartalmazza). A MEME Search programban végzett ANAC13 és HY5 promóterek szekvencia összehasonlításának eredményeként jelöltük ki a pontmutáció által megjelölt, feltételezett  $UVBox^{ANAC13}$  elem lehetséges határait (12. A ábra). A fent említett irányított pontmutációs módszerrel generáltunk egy másik pontmutációt (mut 2) is a -107-es pozícióban (G T), hogy meghatározzuk, vajon a feltételezett elem  $\delta$  scoreö szekvenciájában (CCAAGG) elhelyezked más nukleotid megváltoztatása is módosítja-e a promóter UV-B választ. A két

pontmutációt hordozó kiméra géneket *Arabidopsis*-ba transzformáltuk és részletesen megvizsgáltuk expressziós mintázatukat. A 12.B ábrán látható, hogy ez a két pontmutáció egymástól függetlenül, külön-külön is a promóter UV-B indukálhatóságának csökkenését vonja maga után.

Megvizsgáltuk a feltételezett UVBox<sup>ANAC13</sup> szerepét az ANAC13 promóter vörös fény válaszában is. A pontmutációkat hordozó kiméra géneket, illetve a vad típusú konstrukciót tartalmazó 5 napos, etiolált csíranövények vörös fény indukációjának mértékében nem tapasztaltunk lényeges változást (12.B ábra).

#### **4.4.2. Az azonosított UVBox<sup>ANAC13</sup> szabályozó elem UV-B specifikus indukálhatóságot kölcsönöz a CaMV35S minimál promóternek**

Arra kerestük a választ, vajon a feltételezett UVBox<sup>ANAC13</sup> promóter elem elegendő-e az UV-B válasz kifejezéséhez. Ehhez a közeli promóterrégió -115 bp-tól -104 bp-ig terjedő 12bp hosszúságú fragmentjét, amely tartalmazza az UVBox<sup>ANAC13</sup> szabályozó elem feltételezett core szekvenciáját, dimer formában alkalmaztuk. A CaMV35S promóter a karfiol mozaikvírusból származó konstitutív promóter, amely a hozzátartozó gén folyamatos átírását biztosítja, állandó, nem-specifikus génextpressziót eredményezve. Felhasználásával két konstrukciót hoztunk létre, az egyikben a vad típusú UVBox<sup>ANAC13</sup> szerepel dimer formában a CaMV35Smin promóter (35Smin) előtt, míg a másikban a mutáns UVBox<sup>ANAC13</sup> dimer elzárja meg a 35Smin promótert. Mindkettőt luciferáz riportterhez kapcsoltuk, majd az így kapott kiméra géneket (Pro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc, mutPro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc) (13. A ábra) vad típusú *Arabidopsis*-ba transzformáltuk, és a transzgének UV-B indukációját automata luminométer segítségével vizsgáltuk. Az elsődleges transzformáns növények többsége a Pro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc transzgént alacsony, de mérhető szinten expresszálta. Ezeknek az egyedeknek az öntermékenyülésből származó utódgeneráció (T3) expressziós mintázatát vizsgáltuk 7 napos csíranövényeken a fent leírtakkal azonos módon. A Pro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc a Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc transzgenhez hasonlóan egyaránt indukálódik a hosszabb hullámhosszú és a szünetlen UV-B kezelés hatására is, bár az előbbi konstrukció tényleges aktivitása megközelítőleg csak a 25%-a a teljes hosszúságú promóteret tartalmazó kiméra gén expressziójához képest (13. B ábra).



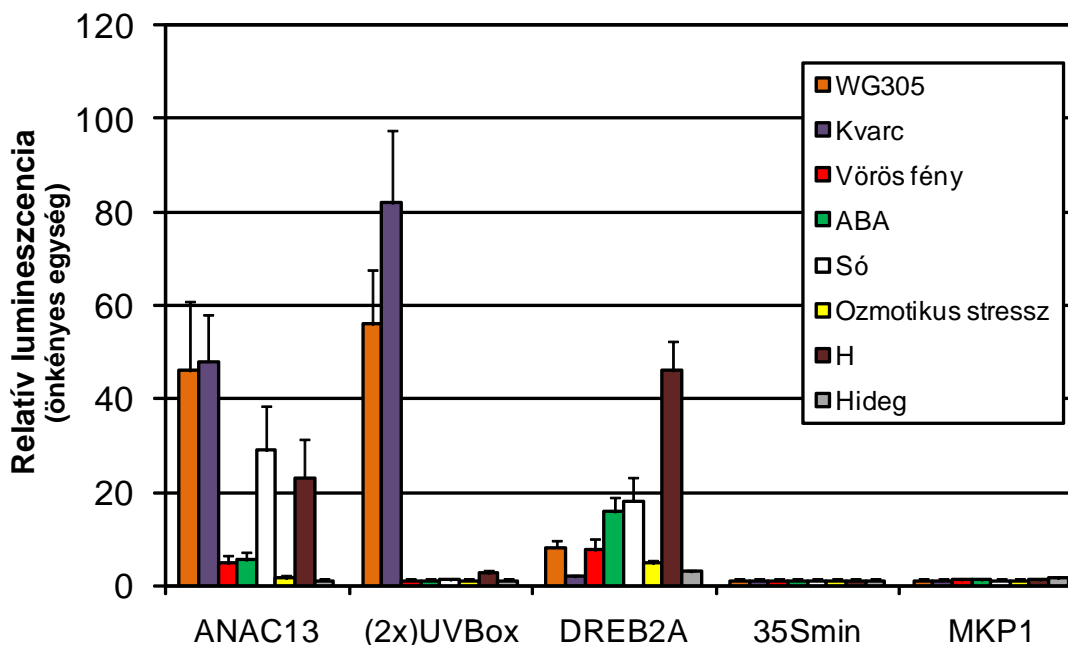
**13. ábra.**

(A) A  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  és a  $mutPro_{2xANAC13-35Smin}::Luc$  kiméra gének felépítésének sematikus ábrázolása. A felső kiemelt szekvencia részlet a vad típusú, míg az alsó a mutáns (C T) szekvenciát mutatja. (B) A  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  és a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  konstrukciók expressziós mintázatának összehasonlítása WG305 és kvarc filter alatt.

Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  alap expressziós szintje következetesen ugyancsak alacsonyabb, mint  $Pro_{ANAC13}::Luc$  esetében. Mindemellett ahogy azt a 14. ábra is mutatja, az alap expressziós szint arányait figyelembe véve, a  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  relatív UV-B indukciója tulajdonképpen magasabb a  $Pro_{ANAC13}::Luc$ -hoz viszonyítva. A (C T) pontmutációt tartalmazó kiméra gén ( $mutPro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$ ) nem mutatott UV-B választ.

#### 4.4.3. Az UVBox<sup>ANAC13</sup> promóter elem szerepe más jelátviteli utakban

Megvizsgáltuk, hogy az új, feltételezett UVBox<sup>ANAC13</sup> cisz szabályozó elem részt vesz-e az ANAC13 más ingerek által kiváltott indukciójának szabályozásában. Meghatároztuk az abszcizinsav (ABA), mint növényi stresszhormon hatását, mely kedvez tlen körülmények között, fként szárazság hatására halmozódik fel, továbbá számos abiotikus stimuláns, köztük a nagy koncentrációjú só (NaCl), ozmotikum (mannitol), alacsony (4°C) és magas h mérséklet (37°C) hatásait. A 14. ábra mutatja, hogy a Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc konstrukció az UV-B sugárzás mellett jól indukálódik só-, h -, és bár kisebb mértékben, de ABA és vörös fény kezelés hatására is.



14. ábra.

Az ábrán jelzett promóter-luciferáz transzgéneket tartalmazó transzgénikus csíranövények relatív lumineszcenciája hosszú hullámhosszú és sz retlen UV-B, vörös fény, ABA, só-, ozmotikus stressz, h stressz és hidegstressz hatására

A DRE elemet köt DREB2A transzkripciós faktor promóterét, mely számos inger, fként h stressz hatására indukálódik (Sakuma és mtsai., 2006) pozitív kontrollként, míg az MKP1 (MAP-kináz-foszfataz 1), mely a Genevestigator adatbázis adatai alapján kedvez tlen körülmények között megközelít leg azonos kifejez dést mutat, és a 35S minimál promóter tartalmazó kiméra géneket negatív kontrollként tüntettük fel. A Pro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc,

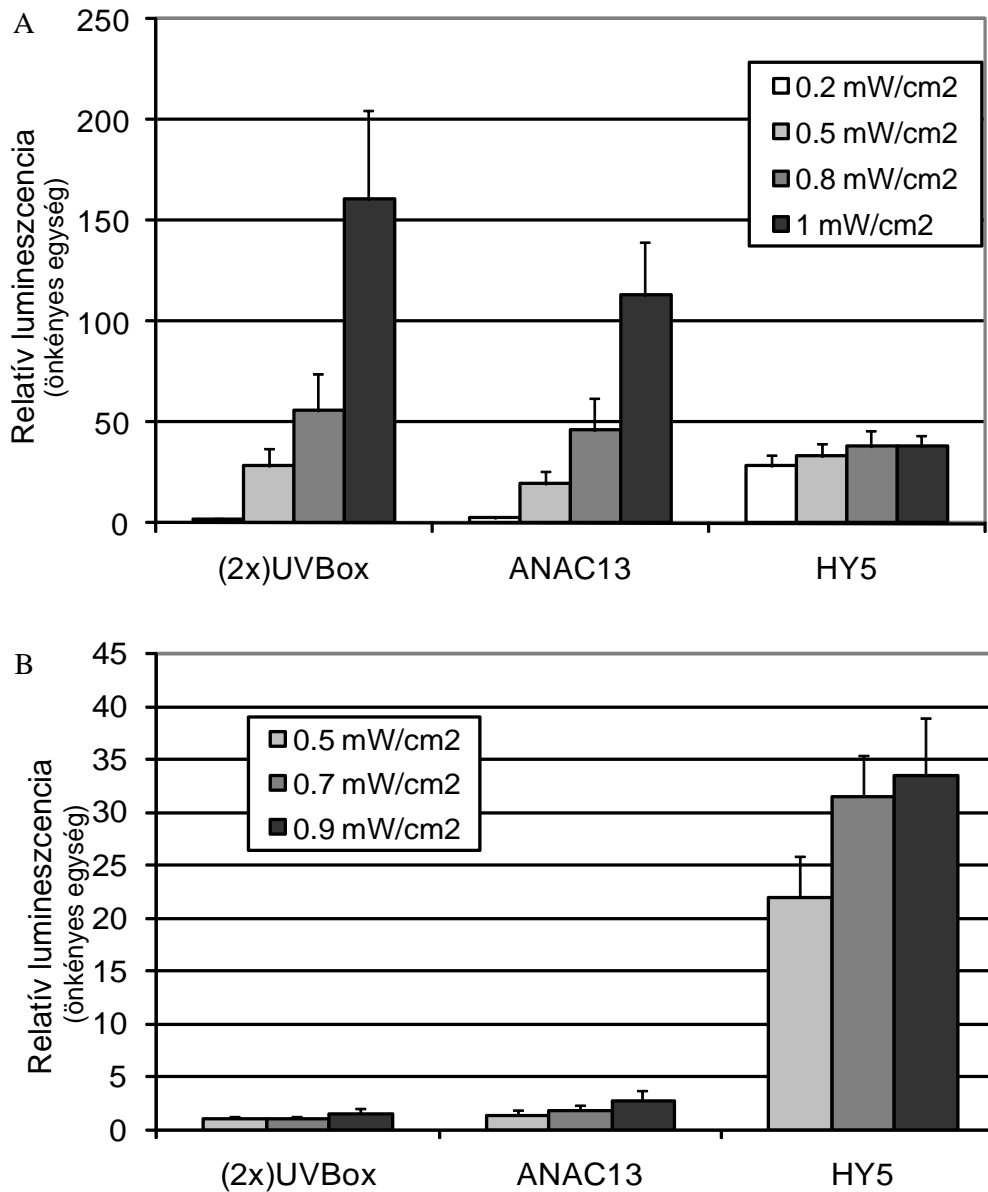
szemben a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  és a  $Pro_{DREB2A}::Luc$  transzgénekkal, specifikusan csak az UV-B sugárzásra indukálódik, más, a kísérletünkben elvégzett kezelések nem voltak rá hatással.

#### 4.4.4. Az $UVBox^{ANAC13}$ promóter elem hullámhossz és intenzitás függése

Jellemeztük a feltételezett  $UVBox^{ANAC13}$  cisz elem UV-B válaszána hullámhossz és intenzitás függését. Összehasonlítottuk a  $Pro_{HYS}::Luc$ ,  $Pro_{ANAC13}::Luc$  és a  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$ , kiméra géneket hordozó transzgenikus vonalak biolumineszcenciájának indukcióját különböző, egyre nagyobb intenzitású, szrt UV-B fény alatt. A széles spektrumú UV lámpa alatt, WG305 filter felhasználásával 25 percig kezeltük a csíranövényeket. A  $Pro_{HYS}::Luc$  konstrukció indukciója már  $0,2 \text{ mW/cm}^2$  intenzitásnál emelkedett szintet mutatott és  $0,8 \text{ mW/cm}^2$ -nél érte el maximumát ( $\sim 40x$ ), míg a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  és a  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  kiméra gének expressziós szintje  $0,2 \text{ mW/cm}^2$  intenzitásnál még nagyon alacsony és folyamatosan emelkedett a magasabb intenzitású besugárzások hatására (15. A ábra).

Ugyanezt a kísérletet végrehajtottuk a monokromatikus UV fényforrás ( $312 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ) felhasználásával is, melynek eredményét a 15. B. ábra szemlélteti. Ebben az esetben a  $Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc$  transzgén nem mutatott jelentős indukciót, még a legmagasabb  $0,9 \text{ mW/cm}^2$  intenzitásnál sem. Hasonlóan, a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  konstrukció is csak egy mérsékelt ( $\sim 3x$ ) indukciót mutatott ezen az értéken. Azonban a  $Pro_{HYS}::Luc$  megközelít leg egyforma mérték választ mutatott a 15. A ábrán bemutatottakhoz képest.





**15. ábra**

Az UVBox<sup>ANAC13</sup> cisz elem UV-B válaszáinak spektrum és intenzitás függése. Pro<sub>2xUVBox</sub>ANAC13-<sub>35Smin</sub>::Luc, Pro<sub>HY5</sub>::Luc és Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc kiméra géneket tartalmazó transzgénikus növények biolumineszcenciájának indukciója (A) széles spektrumú UV lámpa alatt WG305-ös filter felhasználásával, (B) monokromatikus UV lámpa alatt WG305-ös filter felhasználásával.

## 4.5. Új tudományos eredmények

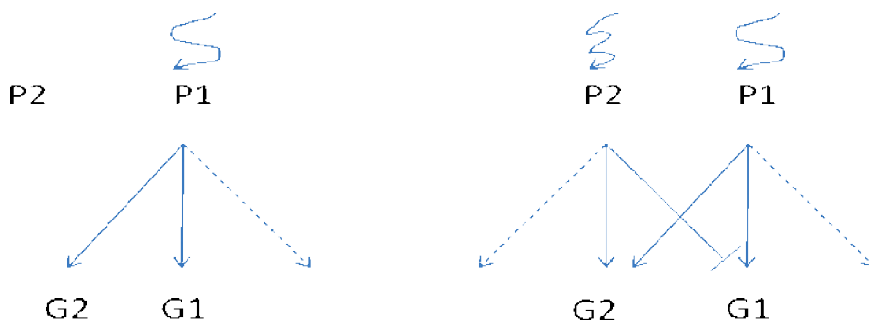
1. Megállapítottuk, hogy az ANAC13 gén UV-B válasza f ként a transzkripció szintjén szabályozott. Az ANAC13 UV-B kezelése során, az el állított négy különböző spektrum közül a WG295 esetében kaptuk a leger sebb transzkriptum felhalmozódást, azaz az ANAC13 transzkripció aktivitása tovább indukálódik, ha az UV-B kezelést kiterjesztjük a rövidebb hullámhosszú tartományok felé.
2. Kimutattuk, hogy az ANAC13 transzkripcionális szint UV-B fényválasza független a már ismert fitokrómoktól és fototropinoktól, habár nem zárhatjuk ki a különböző típusú fotoreceptorok m kódése közötti többszörös átfedés lehet ségét. A kriptokróm szerepe az ANAC13 gén UV-B válaszban feltételezhet .
3. Kimutattuk, hogy az ANAC13 gén részben független a COP1, UVR8 és HY5 génekt l, így valószínűsíthet , hogy az UVR8 függ jelátviteli út elemeinek (UVR8, COP1, HY5), illetve az ANAC13 gén expressziójának ellen rzése különböző jelátviteli út által szabályozott.
4. Vizsgálataink kimutatták, hogy az ANAC13 gén expresszióját az UV-B mellett a vörös fény is indukálja, és igazoltuk, hogy az ANAC13 gén UV-B és vörös fény válasza részben különböző cisz-elemek részvételével szabályozott.
5. EMS mutagenézis segítségével meghatároztunk az ANAC13 gén promóterében egy pontmutációt, amely markánsan redukálta a  $Pro_{ANAC13}::Luc$  transzgén UV-B indukcióját.
6. A meghatározott pontmutáció szerepének tisztázásához további pontmutációt generálva sikerült meghatároznunk egy új cisz-szabályozó elemet, melyet  $UVBox^{ANAC13}$  jelöléssel láttunk el. Ez az újonnan meghatározott szabályozó elem, kritikus szerepet játszik az ANAC13 UV-B válaszában irányításában. Vizsgálataink rámutattak, hogy a maximális UV-B válasz elérésében a közeli promóter régióban lévő  $MRE^{ANAC13}$ ,  $UVBox^{ANAC13}$  és esetleg a többi  $ACE^{ANAC13}$  és  $MRE^{ANAC13}$  elem közösen vesznek részt különböző transzkripciós faktorok kötésével, melyek még meghatározásra várnak.
7. Bemutattuk, hogy a munkánk során azonosított  $UVBox^{ANAC13}$  cisz-szabályozó elem nem csak szükséges, de elegendő is az UV-B válaszhoz, továbbá igazoltuk, hogy az  $UVBox^{ANAC13}$  szabályozó funkciója UV-B sugárzásra specifikus.

## 5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 5.1. Az UV-B által indukált transzkripcionális változások vizsgálata

#### 5.1.1. Magas UV-B indukciót mutató gének expressziós mintázata

Az UV-B sugárzás által indukált gyors és átmeneti transzkripció változások, illetve a transzkripció faktorok számottevő jelenléte az UV-B indukált gének között arra utal, hogy hasonlóan a látható fény jelátviteli folyamataihoz, az UV-B hatására is összetett szabályozási hálózatok aktiválódnak. A 15 perces szélessávú UV-B kezelésnek kitett *Arabidopsis* Wassilewskija ökotípusú csíranövények microarray analízis során kapott 100 indukált génből 62 kizárólag a hosszabb hullámhosszú UV-B-re, míg a maradék 38 gén, köztük az ANAC13 is, az alacsonyabb hullámhosszú WG295 és kvarc kezelésre is indukálódott (Ulm és mtsai., 2004). Ez azért érdekes, mert a WG305, WG295 és kvarc kezelés azonos spektrumot fed le azzal a különbséggel, hogy a WG295 és kvarc kiterjed a rövidebb hullámhossz irányába (1. ábra). Mindez rámutat arra, hogy a rövidebb hullámhosszú UV-B sugárzás negatívan szabályozza az alacsony energiaszintű UV-B által indukált gének transzkripcióját, azt sugallva, hogy legalább két, egymással kölcsönhatásban lévő UV-B jelátviteli út létezik. A feltételezett két egymással kapcsolatban lévő UV-B érzékelési és jelátviteli út egyikét (G1) az alacsonyabb energiaszintű (P1), míg a másikat (G2) a magasabb energiaszintű (P2) UV-B váltja ki. Amikor mind a két jelátviteli út aktiválódott, akkor az utóbbi negatívan avatkozik be az előbbi útvonalba, visszafojtva az előbbi jelátviteli út (G1) által szabályozott gének csoportjának transzkripcionális indukcióját (Ulm és Nagy, 2005).



**Ábra 5.1.** UV-B által indukált feltételezett transzkripcionális válaszok

A rövidebb hullámhosszú UV-B antagonistá szabályozásának egyszer sített modellje (Ulm és mtsai., 2004).  
Baloldal: hosszabb hullámhosszú UV-B által kiváltott események. Jobb oldal: rövidebb hullámhosszú UV-B által kiváltott események.

A microarray analízis eredményeire támaszkodva érdeklődésünket a legnagyobb indukciót mutató gének irányába fordítottuk. A kiválasztott 10 legmagasabb UV-B indukciót mutató gén (4.1. Táblázat) promóter régiójához a transzkripcionális aktivitás markereként használt luciferáz gént kapcsoltuk, és megvizsgáltuk, hogy expressziójuk transzkripcionális szinten, és/vagy mRNS stabilitás szintjén szabályozott. A kiméra gének luciferáz aktivitásának változásai hosszabb hullámhosszú, illetve szünetlen UV-B kezelést követően megértették és egyben kiterjesztették a microarray analízisben kapott adatokat. Egy részük csak a hosszabb hullámhosszú UV-B-re, másik részük, köztük a ZAT12, mely az abiotikus stresszválaszok egyik transzkripciósi faktora (Holm és mtsai., 2002), vagy az At2g36750, mely az UDP-glikoziltranszferázok családjának tagja és az ANAC13 rövidebb hullámhosszú UV-B-re is indukálódott (Ulm és mtsai., 2004). Emellett jelzik, hogy mind a tíz kiválasztott gén UV-B válasza függően a transzkripció szintjén szabályozott. Míg a Pro<sub>ANAC13</sub> közel azonos expressziós mintázatot és szintet mutat a hosszabb hullámhosszú, és a szünetlen UV-B alatt is, addig a Pro<sub>HY5</sub> indukálhatósága szünetlen UV-B alatt nagymértékben redukált a nagyobb hullámhosszú UV-B kezeléssel összehasonlítva.

### **5.1.2. Az ANAC13 gén korai UV-B válaszáinak spektrális függése**

A szélessávú fényforrás lehetőséget ad arra, hogy a különböző UV-B tartományok transzkripcionális hatásait megvizsgáljuk. Az UV kezelés során, csökken transzmissziós tulajdonságú alulvágó filterek felhasználásával, négy különböző UV spektrumot állítottunk elő (1. ábra). A WG327-es alulvágó filtert negatív UV-B kontrollként használtuk, az alacsony szintű UV-B sugárzást a WG305 alulvágó filterrel állítottuk elő, az alacsonyabb hullámhosszú, magas szintű UV-B kezelésekhöz a WG295 filtert, míg a szünetlen UV-B sugárzáshoz (legerősebb UV-B) kvarc üveget használtunk. Ahogy azt már korábban láttuk, a 15 perces alacsony szintű UV-B (WG305) kezelés széles sávú fényforrás alatt, gének egy csoportjának transzkripcionális aktivációját eredményezi. Ezek a gének transzkripcionális profiljuknak megfelelően két csoportra bonthatóak, amikor az UV-B kezelést a rövidebb hullámhosszú tartományok felé kiterjesztjük (WG295, kvarc). Az UV-B által indukált génexpressziós vizsgálat eredményeként azt kapták, hogy 6 órával a 15 perces alacsony szintű UV-B kezelést (WG305) követően csak 1 gén, a WG295 filter használata után 165 gén, kvarc kezelést követően pedig 1716 gén mutatott transzkripcionális szintaktivációt (Ulm és mtsai., 2004). Ez egyértelműen azt jelzi, hogy az alacsony szintű besugárzásnak nincs hosszú távú hatása a sejtes folyamatokra. A Brosche és Strid által (2003) javasolt kategóriák közül, UV-B kezeléseink a nagyon alacsony (WG305) és alacsony (kvarc) kategóriákba esnek. Ezzel összhangban még kvarc kezelés hatására sem aktiválódtak a Brosche és Strid modellbe tartozó közepes és magas UV-B markerek. Ezért ezt a

fajta kezelést kisebb hatásúnak tekintjük, mely csak átmeneti transzkripcionális változásokat okoz és csak elhanyagolható károsodással jár (Brosche és Strid, 2003; Oravecz és mtsai., 2006). Az ANAC13 UV-B kezelése során, a csökken transzmissziós tulajdonságú alulvágó filterek felhasználásával el állított négy különböző spektrum közül a WG295 esetében kaptuk a leger sebb transzkriptum felhalmozódást. Ez ugyancsak meger síti a microarray analízis eredményét, azaz az ANAC13 transzkripció aktivitása tovább indukálódik, ha az UV-B kezelést kiterjesztjük a rövidebb hullámhosszú tartományok felé.

### **5.1.3. Az ANAC13 transzkripcionális szint UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól**

A legtöbb fejl dési folyamat során általában egynél több fotoreceptor vesz részt a fény érzékelésében, ami a különböző fény indukált utak közötti kölcsönhatások komplex hálózatát eredményezi. Szemben a látható fény és az UV-A sugárzás érzékelésével és jelátviteli folyamatával, az UV-B specifikus válaszok közvetítésében résztvev elemekről jóval kevesebb ismeretanyag áll rendelkezésünkre és az érzékelésben résztvev fotoreceptor molekuláris azonosítása is hátra van még. Ahogy egyre világosabbá válik, hogy a növények több, egymástól elhatárolt UV-B útvonalat használnak, valószínűsíthető, hogy ezek közül legalább néhányban részt vesznek a meglévő fotoreceptorok. Különböző fotoreceptor mutánsok RNS gél blot analízisével kimutatták, hogy az UV-B által kiváltott génaktiváció független a fitokrómoktól, a kriptokrómoktól és a fototropinoktól, azaz a vörös/távoli vörös, kék és UVA érzékel receptoroktól (Ulm és mtsai., 2004). Ismert, hogy a bZIP transzkripció faktor HY5 transzkripcionálisan indukálódik a fitokróm által irányított jelátviteli folyamatokban (Tepperman és mtsai., 2001; Quail és mtsai., 2002a). Érdekes azonban, hogy a HY5 UV-B indukciója teljesen független a fitokrómoktól. Ezen kívül a HY5 legközelebbi homológja, a HYH UV-B indukciója ugyancsak független az ismert fotoreceptoroktól (Oravecz és mtsai., 2006). Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy az UV-B által indukált transzkripció, specifikus UV-B fotoreceptoron vagy fotoreceptorokon keresztül valósul meg. További vizsgálatok egy az UV-B és a kriptokróm jelátviteli utak közötti kapcsolatot sejtetnek. Az UV-B aktivált gének hiperérzékenysége kriptokróm (*cry1cry2*) mutánsokban, nagyobb hullámhosszú UV-B sugárzás hatására, a kriptokrómok negatív szabályozó szerepét jelzik az UV-B válaszban (Oravecz és mtsai., 2006). Emellett a kriptokrómok hiánya a rövidebb hullámhosszú tartományokban (kvarc) az antagonista hatás feler sődéséhez vezet, ami arra utal, hogy a kriptokróm jelátviteli út negatívan szabályozza a magasabb szint UV-B (P2) jelátvitel antagonista részét. Azonban a kvarc indukálta gének nem mutatnak hiperérzékenységet kriptokróm mutánsokban a rövidebb

hullámhosszú régióban, ezért úgy tűnik, a kriptokróm útvonal nem hat a P2 jelátvitel G2 szabályozási részére (Oravecz és mtsai., 2006). Ezekből kiindulva megfigyelésekből kiindulva vizsgáltuk meg az ANAC13 viselkedését, és kimutattuk, hogy transzkripcionális szinten UV-B fényválasza független a már ismert fitokrómoktól és fototropinoktól, habár nem zárhatjuk ki a különböző típusú fotoreceptorok működése közötti többszörös átfedés lehetőségét. A kriptokróm 1 és 2 (*cry1/cry2*) kettős mutáns esetében az eddig megfigyelt expresszió aránya a hosszabb és rövidebb hullámhosszú UV-B kezelés esetében eltolódott a hosszabb hullámhossz irányába, így szerepe az ANAC13 gén UV-B válaszban feltételezhető.

#### 5.1.4. Az ANAC13 UV-B jelátvitelben elfoglalt pozíciója

Már azonosították az UV-B által indukált fotomorfogenetikus jelátviteli folyamat néhány kulcsfontosságú szabályozó elemét, mint például a bZIP transzkripciós faktor HY5, az E3 ubikvitin-ligáz COP1 és az UVR8 fehérjét. A *hy5*, *cop1*, *uvr8* funkcióvesztéses mutációkat hordozó növények kisebb UV-B toleranciával rendelkeznek (Kliebenstein és mtsai., 2002; Ulm és mtsai., 2004; Brown és mtsai., 2005; Oravecz és mtsai., 2006). A COP1 egy olyan multifunkcionális fehérje, amelyet először a fotomorfogenezis represszoraként írtak le (Yi és Deng, 2005). Később rámutattak a COP1 UV-B által indukált fotomorfogenezisben betöltött szerepére, amely különbözik a látható fényben való represszor funkciótól (Oravecz és mtsai., 2006). Az UVR8 fehérje, ellentétben a COP1-gyel, specifikus az UV-B által indukált fotomorfogenetikus folyamatokra, bár még elképzelhető, hogy nem UV-B-hez kötött funkciót is feltárják eddig még nem vizsgált körülmények között (Brown és mtsai., 2005). Kimutatták, hogy növényekben az UVR8 és COP1 fehérjék a sejtmagban közvetlenül UV-B specifikus kölcsönhatásba lépnek, amely a jelátviteli folyamat egy nagyon korai lépése, és hogy ez az interakció biztosítja a növények UV-B sugárzásához való alkalmazkodását, illetve az ellene való védekezést természetes környezetben (Ulm és mtsai., 2009). A HYH-nak, és főleg a HY5-nek a COP1-től és az UVR8-től downstream irányban van fontos szerepe az UV-B indukálta jelátviteli folyamatokban (Brown és mtsai., 2005; Oravecz és mtsai., 2006; Brown és Jenkins 2008). Egy előző tanulmányban microarray analízissel azonosítottak 639 gént, melyet szélessávú UV-B indukált kifejezett vad típusú növényekben. Ezek többsége (567 gén) az *uvr8-1* mutánsokban is normálisan indukálódik (Brown és mtsai., 2005). Ez az első vizsgálat azt jelezte, hogy az UV indukált gének közül 11% az UVR8 fehérjétől függ. Egy későbbi tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy az UVR8 független gének nagy része valószínűleg nem UV-B specifikus jelátviteli folyamatokból származik, hanem például az UV-B stressz folyamatokból

(Brown és Jenkins 2008). Hasonlóképpen egy másik microarray analízis szélessávú UV-B kezelés alatt azt mutatta, hogy az UV-B által indukált géneknek körülbelül 31%-a függ a HY5-től és 75 %-a a COP1-től (Oravecz és mtsai., 2006). Egy nemrég bemutatott vizsgálat, melyben kiegészítésként keskenysávú UV-B besugárzást követően vizsgálták a gének működését, világosabbá teszi a képet. Ilyen, az UV-B indukálta fotomorfogenezisre specifikus körülmények között, a válaszban résztvevő gének döntő többségének expressziója a COP1-től és az UVR8-tól függ (Favory és mtsai., 2009). Ebben a munkában szemi-kvantitatív RT-PCR vizsgálat során összevetettük az endogén ANAC13 gén expressziós mintázatát UV-B-vel kezelt vad típusú növényekben, illetve *cop1-4*, *uvr8-1* és *cop1-4/uvr8-1* dupla mutáns genetikai hátterekben. Megvizsgáltuk a ProANAC13::Luc riportter konstrukció UV-B indukcióját vad típusú és *cop1-4* genetikai háttérben. Jelentős expressziós változást egyik esetben sem tapasztaltunk, így ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeire alapozva megállapíthatjuk, hogy az ANAC13 gén részben független a COP1, UVR8 és HY5 génektől. Ezek a megfigyelések megerősítik és kiterjesztik a korábbi eredményeket, mely szerint az UVR8 függő jelátviteli út elemeinek (UVR8, COP1, HY5), illetve az ANAC13 gén expressziójának ellenőrzése összetett, és valószínűleg különböző jelátviteli út által szabályozott (Ulm és mtsai., 2004).

## **5.2. Az ANAC13 fényválasza**

### **5.2.1. Az ANAC13 aktiválódik vörös fény kezelésre**

Az UV-B sugárzás által indukált jelátviteli út eddig azonosított tagjainak legtöbbje, számos más fény jelátviteli út szereplőjeként is ismert. A HY5 a fotomorfogenezis első és legintenzívebben vizsgált pozitív szabályozója. A *hy5* mutánsok részlegesen etiolált fenotípust mutatnak valamennyi fényminőség alatt (Oyama és mtsai., 1997; Ang és mtsai., 1998). Mint kulcsfaktor, részt vesz a fény által indukált gének 20%-nak szabályozásában (Ma és mtsai., 2002). Úgy tűnik, a HY5 integrációs pontot jelent a fény és hormon jelátvitelben (Cluis és mtsai., 2004). Egyértelmű, hogy a HY5-nek fontos szerep jut a növényi fejlődésben, feltehetően downstream irányban működik több fény által kiváltott és más fejlődésben szerepet játszó jelátviteli folyamatban (Hudson 2000; Cluis és mtsai., 2004). A HY5-tel nagyarányú homológiát mutató HYH nem csak UV-B, hanem kék fényre adott válaszreakciókban is szerepet játszik (Holm és mtsai., 2002). Az E3 ubikvitin-ligáz COP1 szerepe ugyancsak szerteágazó, melyet az is jól mutat, hogy a fotoreceptorok: PhyA, PhyB, Cry1 és Cry2 közvetlen kapcsolatban vannak a COP1-el (Wang és mtsai., 2001; Yang és mtsai., 2001; Seo és mtsai., 2004). A növényekben alacsony szintű UV-B hatására aktiválódik az UV védelemben résztvevő gének transzkripciója. A fenilpropanoid út egyik kulcsenzime a KALKON-SZINTÁZ (CHS), transzkripcionálisan

indukálódott UV-B pulzusok hatására petrezselyem sejt kultúrában (Frohnmeier és mtsai., 1999). Kimutatták, hogy a CHS gén UV-B által szabályozott expressziójában az UVR8-é a közvetít szerep (Jenkins és mtsai., 2009). A CHS valószínűleg a befejező lépése lehet ennek az útvonalnak: expressziója transzkripcionális szinten szabályozott, indukciós kinetikája lassabb, mint a HY5-é, de kifejeződéséhez igényli a COP1, UVR8 és HY5 részvételét (Brown és mtsai., 2005; Oravecz és mtsai., 2006). Az UV-B mellett a vörös/távoli vörös és a kék/UV-A fény is szabályozza a CHS expresszióját, így tehát a fitokróm, kriptokróm és UV-B jelátviteli utak egyaránt részt vesznek a fényszűrő pigmentek képződéséért felelős kulcsenzim transzkripció szabályozásában (Jenkins és mtsai., 2001). Vizsgálatainkból kiderül, hogy az ANAC13 gén expresszióját az UV-B mellett a vörös fény is indukálja. A vörös fény indukció valamivel gyorsabban éri el maximumát, azonban lényegesen alacsonyabb szintet mutat az UV-B válasszal összevetve. Ez azt sugallja, hogy az ANAC13 expressziója komplex, feltehetően különböző jelátviteli utak által szabályozott.

### **5.2.2. Az ANAC13 UV-B és vörös fény válasza részben különböző cisz-elemek részvételével szabályozott**

Hartmann és mtsai., (1998) arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző fototranszdukciós utak transzkripció faktorokat szabályoznak, melyek közös cisz-szabályozó elemekkel kerülnek kölcsönhatásba. A CHS, illetve további, a fenilpropanoid bioszintézis útban résztvevő CFI, F3H és FLS gének UV-B és UV-A/kék fény által indukált expressziós változásai, összetett fényszabályozó elemek, LRUs/LREs (light-regulatory units/light-regulatory elements) részvételével történnek (Hartmann és mtsai., 1998, 2005). De ezek az elemek szükségesek a vörös/távoli vörös és kék fény által indukált transzkripcióhoz is (Kaiser és mtsai., 1995). Ezek a fényszabályozó elemek az *Arabidopsis thaliana*-ban két különböző típusú cisz-regulátor elemet tartalmaznak: a bZIP-kötő ACE (ACGT-containing element) és az MRE (MYB-recognition element) típusú elemeket (Hartmann és mtsai., 1998; Weisshaar és mtsai., 1991; Dröge-Laser és mtsai., 1997; Feldbrügge és mtsai., 1997). Az említett fenilpropanoid bioszintézis útban szereplő gének promóter régióit összevetve az ANAC13 gén promóterével azt kaptuk, hogy az ANAC13 közel 1,5 kb hosszúságú promóter szakasza tartalmaz két MRE<sup>CHS</sup> és három ACE<sup>CHS</sup> típusú elemet, melyek közül négy, a vizsgált promóterekben tapasztaltakhoz hasonlóan párban helyezkedik el. Logemann és mtsai., (2002) petrezselyem sejt kultúrában végeztek expressziós vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogy a patogénválasz milyen módon represszálja az UV védelemben szerepet játszó flavonoidok bioszintézis útját. A jelátvitelben szereplő egyik gén, az acyl-CoA-oxidáz promóterén végeztek mutációs és deléciós analízist, mert úgy gondolták, a



promóter közeli régiójában elhelyezkedő MRE és ACE elemek állhatnak a folyamat hátterében. A promóter konstrukciókat GUS riporter génhez kapcsolták. Vizsgálataik eredményeként kiderült, hogy a közeli promóter szakasz két ACE eleme közvetíti az átkapcsolást a két válaszfolymat között. Ahhoz, hogy meghatározzuk a feltételezett cisz-elemek funkcióját, illetve hogy kiderítsük, hogy az ANAC13 UV-B és vörös fény indukciója egymástól független, vagy azonos szabályozó elemeken keresztül valósul-e meg, kísérleteinkben mi is különböző promóter mutánsok expressziós mintázatát vizsgáltuk meg *Arabidopsis* csíranövényekben. Vizsgálatainkat összegezve megállapíthatjuk, hogy az ANAC13 maximális UV-B indukciójához két promóter régióra van szükség: a közeli promóter régió rövid (-110-+24) szakasza, illetve az a rövid régió, amely tartalmazza a feltételezett MRE<sup>ANAC13</sup> szabályozó elemet (-146-tól -110-ig). A 9. ábra A/3-as konstrukciónál mért indukció, illetve a 4-es és 6-os konstrukciók esetében mért értékek közötti éles kontraszt abból származhat, hogy az MRE<sup>ANAC13</sup> elemmel együtt működő, eddig még ismeretlen elem(ek) a -110-+24 közötti régióban található vagy az általunk kijelölt deléción (-110) pont egy fontos szabályozó elemet vág ketté. Ezen felül a vizsgált promóter vörös fény indukciója ugyancsak két régióhoz köthet. Mindenképp szükséges hozzá a promóter távoli (-1457-től -198-ig) régióján belül egy még ismeretlen elem közreműködése, hiszen a -198-tól +24-ig terjedő promóter régiót tartalmazó kiméra gén nem mutat vörös indukciót. Abban az esetben, amikor a rövid -110-től +24-ig terjedő promóter szakaszt a CaMV35S minimál promóterrel helyettesítettük (9. ábra A/5. konstrukció), a vörös fény válasz szintje visszaesett, de még kimutatható (~5x) volt. Így feltehetően ebben a régióban található elemek is hatással lehetnek a vörös fény indukcióra.

### 5.3. Feltételezett UVBox azonosítása és jellemzése

#### 5.3.1. Pontmutánsok azonosítása luciferáz alapú genetikai szűrés során

Az eddigi vizsgálataink azt mutatták, hogy a korábbi részletes tanulmányok alapján azonosított, feltételezett két MRE<sup>ANAC13</sup> és három ACE<sup>ANAC13</sup> típusú elem nem számít érdekes kritikus pontnak az ANAC13 promóter UV-B válaszában. Feltételezésünk szerint léteznie kell a promóter közeli szakaszában (-146-tól -110-ig) található MRE<sup>ANAC13</sup> elemmel együtt működő, eddig még ismeretlen elem(ek)nek a -110-+24 közötti régióban. Célunk továbbra is az ANAC13 UV-B függő jelátvitel elemeinek az azonosítására maradt, ezért elindítottunk egy luciferáz riporter gén alapú genetikai szűrés vizsgálatot *Arabidopsis*-ban. AZ EMS mutagenézis során nyert, csökkent luciferáz aktivitást mutató egyedek közül két mutánsra fókuszáltunk, melyek egymástól független pool-okból származtak, és amelyekben csak a Pro<sup>ANAC13</sup>::Luc transzgén UV-B indukciója volt érintett, az endogén ANAC13 UV-B aktivitása változatlan maradt.

Adataink azt mutatták, hogy mindkét mutáns ugyanazt az egy pontmutációt hordozta (C → T tranzíció) a promóter -110 bp-os pozíciójában. A kritikus -110 bp-os pozícióban lévő citozin melletti nukleotidok esetleges UV-B válaszban való szerepének tisztázásához további pontmutációt generáltunk a -107 bp-os pozícióban (G → A). A mutáns kiméra géneket tartalmazó transzgenikus növények expressziójának részletes tanulmányozása után tisztán kirajzolódott, hogy mindkét pontmutáció egymástól függetlenül és markánsan redukálta a Pro<sup>ANAC13</sup>::Luc UV-B indukcióját. Az eddigi adatok azt is jól mutatják, hogy a mutáns Pro<sup>ANAC13</sup>::Luc konstrukció UV-B válasza hasonló az ANAC13 promóter felső régióját tartalmazó (-1457- -110) konstrukció válaszához. Mindez arra utal, hogy ez az újonnan meghatározott szabályozó elem, melyet UVBox<sup>ANAC13</sup> jelöléssel láttunk el (feltételezhető core szekvenciája CAAG), egy jelentősebb cisz-szabályozó elem az ANAC13 promóter UV-B válaszában irányításában. Annak ellenére, hogy az UVBox<sup>ANAC13</sup> játssza a fő szerepet, adataink azt sugallják, hogy az ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemek is közreműködhetnek az ANAC13 maximális UV-B válaszában. Az ANAC13 promóter felső régióját tartalmazó (-1457-től -110-ig) konstrukció, amely az UVBox<sup>ANAC13</sup> elemet csonkítva tartalmazza és hordozza az ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemeket, ha csak nagyon alacsony szinten is, de mutat UV-B indukciót. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elemek együttesen működhetnek. Azonban az is látszik, hogy a közeli régióban (-146-től -110-ig) található MRE<sup>ANAC13</sup> módosítása megszünteti az UV-B választ, jelezve, hogy a promóter közeli szakaszán (-146-től -110-ig) található ACE<sup>ANAC13</sup> és a távolabb elhelyezkedő ACE<sup>ANAC13</sup> valamint MRE<sup>ANAC13</sup> elemek önmagukban nem funkcionálnak. Ezért azt a hipotézist preferáljuk, miszerint a maximális UV-B válasz elérésében a közeli promóter régióban lévő MRE<sup>ANAC13</sup>, UVBox<sup>ANAC13</sup> és esetleg a többi ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elem közösen vesznek részt különböző transzkripciós faktorok kötésével, melyek még meghatározásra várnak. Bemutattuk, hogy az UVBox<sup>ANAC13</sup> nem vesz részt az ANAC13 vörös fény indukciójában. Ezt az bizonyítja, hogy amíg a promóter távoli régiójának (-1457-től -198-ig) az eltávolítása felszámolta, addig a teljes hosszúságú promóterben az UVBox<sup>ANAC13</sup> elemet érintő pont mutációk nincsenek hatással a vörös fény aktivációra. Azonban adataink nem zárják ki annak a lehetőségét, mely szerint az ANAC13 vörös fény válasza a promóter közeli régiójában található, eddig még azonosítatlan cisz-elemnek és az ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> egységek együttes hatásából származik.

### 5.3.2. Az azonosított UVBox<sup>ANAC13</sup> specifikus cisz-szabályozó elemként működik az UV-B válaszban

A fény és más környezeti szignálok gyakran közösen vesznek részt egy-egy specifikus fejl. dési válasz közvetítésében, mely jelzi ezek között a jelátviteli utak közötti kapcsolódási pontok meglétét. A legtöbb tanulmány f.ként egy környezeti inger hatásaira fókuszál, kiragadva azt az összefüggések hálózatából, hiszen a természetben a specifikus környezeti ingerek gyakran nehezen jellemezhetők és különíthetők el más hatásoktól. Nagy kihívást jelent a különböző szignáltranszdukciós utak közötti kölcsönhatások feltárása, melyeket nagyszámú, eltérő stresszfaktor határoz meg, mint például a növényevők sebzései, a patogén mikroorganizmusok okozta fertőzések, szárazság, só, extrém hőmérsékletek vagy az UV-B sugárzás (Stratmann, 2003). Mindezek ellenére számos részletes kutatásnak sikerült feltárnia átfedéseket a különböző jelátviteli utak között. Az UV-B indukálta jelátviteli hálózat igazoltan átfed a sebzés válasz jelátvitelével (Logemann és mtsai., 2002; Izaguirre és mtsai., 2003). Megállapították, hogy a fenilpropanoid bioszintézis út enzimait kódoló gének (PAL, CHS), mindkét stimulus hatására aktiválódnak. A fenilpropanoidok nagy része fényszóróként funkcionál, és/vagy elhárítja a rovarátadásokat. A microarray analízisek során nagy számban azonosítottak olyan UV-B választ adó géneket, melyek más stresszfaktorokra is indukálónak (Ulm és mtsai., 2004). A *DREB2A* transzkripciósfaktor szerepét elsőként a szárazság stresszválaszban tárták fel, de ismert a só, hő és fény jelátvitelben való részvétele is (Nakashima és mtsai., 2000; Ulm és mtsai., 2004). A *Zat12* transzkripciósfaktor központi szerepet játszik általánosan az abiotikus stresszválaszokban *Arabidopsis*-ban (Sholpan és mtsai., 2005). A NAC domain protein család számos tagja is egyszerre több abiotikus és biotikus stressz jelátviteli folyamat szereplője. Például a paradicsom *StNAC* génje sebzés és patogének hatására, az *Arabidopsis ATAF1* génje emellett szárazság stressz, míg az *ATAF2* vírusfertőzés hatására is aktiválódik (Colligne és Boller, 2001; Lu és mtsai., 2007; Wang és mtsai., 2009). A repce *BnNAC* génje indukálódik sebzés, patogén, hideg és szárazság stressz esetében is (Hegedűs és mtsai., 2003). A cukornád *SsNAC23* génje kapcsolatban van a kártevők, hideg és víz okozta stressz folyamatokkal (Nogueira és mtsai., 2004). Ebből adódóan feltehetőleg reguláló faktorok egész seregére lehet szükség bizonyos gének megfelelő szabályozásához. A gének indukációjának megértéséhez fontos lenne tudni, hogy vajon a különböző ingerek a transzkripciót elkülönült vagy közös cisz-elemekeken keresztül aktiválják-e. Az ANAC13 promóter indukálódik a vizsgálatunkban szereplő abszcizinsav (ABA), és a legtöbb abiotikus környezeti inger, köztük a vörös fény, só és hő hatására is. Két olyan kiméra génkonstrukciót hoztunk létre ( $Pro_{2 \times UVBoxANAC13-35Smin}::Luc$ ,  $mutPro_{2 \times UVBoxANAC13-35Smin}::Luc$ ), melyekkel bemutathattuk, hogy a munkánk során azonosított

UVBox<sup>ANAC13</sup> cisz-szabályozó elem nem csak szükséges, de elegendő is az UV-B válaszhoz. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az ép UVBox<sup>ANAC13</sup>, legalábbis dimer formában, elegendő ahhoz, hogy a Pro<sub>35Smin</sub>::Luc promóter konstrukciót UV-B válasszal ruházza fel. Meghatároztuk, hogy az UVBox<sup>ANAC13</sup> szabályozó funkciója UV-B-re specifikus, a Pro<sub>2xUVBoxANAC13-35Smin</sub>::Luc transzgén expressziója nem érintett más, a kísérleteinkben felhasznált biotikus és abiotikus ingerek által, szemben a Pro<sub>ANAC13</sub>::Luc és Pro<sub>DREB2A</sub>::Luc konstrukciókkal. Mindez azt jelenti, hogy az UVBox<sup>ANAC13</sup> egy specifikus cisz-elemként működik az UV-B indukálta transzkripció közvetítésében.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az ultraibolya (UV) sugárzás a földfelszínre jutó napfény rendkívül lényeges részét képezi. Mivel a sztratoszférikus ózonréteg a 290 nm-nél rövidebb hullámhosszúságú sugárzást teljes mértékben elnyeli, így csak az UV-B (280-320 nm) tartomány hosszabb hullámhosszúságú része és a teljes UV-A (320-400 nm) tartomány éri el a földfelszínt és rendelkezik biológiai jelentéssel. Az UV sugárzásnak az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásai, melyek gyakorlatilag minden fontosabb biomolekula és sejtalkotó sérüléséhez vezethetnek, jól ismertek. Az alacsony szintű (hosszabb hullámhosszúságú, kis dózisé) UV-B sugárzás azonban nemcsak környezeti stressztényező, hanem információs szignál is, mely specifikus szabályozási mechanizmusokat indukál, hasonlóan az ismert fotoreceptorok által detektált látható és UV-A fényhez.

E tanulmány célja az volt, hogy mélyebb betekintést nyújtson az UV-B sugárzás érzékelésének és jelátvitelének hátterében lévő molekuláris mechanizmusokba, és hogy rávilágítson ezeknek a látható és UV-A fény szabályozta folyamatokhoz való viszonyára. Elsőként az alacsony szintű UV-B által kiváltott transzkripciós változások vizsgálata került kitérésre, mely további alapot biztosított lehetséges új komponensek azonosítására és jellemzésére. Ezek alapján további célpontként az ANAC13 UV-B jelátvitelben betöltött szerepének és viszonyának a felderítése szerepelt.

Munkánk során megállapítottuk, hogy az ANAC13 gén UV-B válasza független a transzkripció szintjén szabályozott. Megerősítettük és egyben kiterjesztettük a korábbi microarray analízis eredményét, mely alapján az ANAC13 a hosszabb és rövidebb hullámhosszú UV-B-re is választ ad, illetve transzkripciós aktivitása tovább indukálódik, ha a kezelést kiterjesztjük a rövidebb hullámhosszú tartományok felé. Transzkripcionális szintű UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól, vizsgálataink alapján a kriptokrómok szerepe feltételezhető. Alátámasztottuk azt a korábbi megfigyelést, mely szerint expressziója az UVR8 függő jelátviteltől valószínűleg legkülönbözőbb jelátviteli út által szabályozott.

Expresszióját az UV-B mellett a vörös fény is indukálja, mely azt sugallja, hogy az ANAC13 expressziója komplex, feltehetően különböző jelátviteli utak által szabályozott. A közel 1,5 kb hosszúságú promóter szakaszán azonosítottunk a fény szabályozó elemekre jellemző két MRE és három ACE típusú, valamint egy új, általunk UVBox<sup>ANAC13</sup>-nak jelölt cisz-szabályozó elemet. Hipotézisünk szerint a maximális UV-B válasz elérésében a közeli promóter régióban lévő MRE<sup>ANAC13</sup>, UVBox<sup>ANAC13</sup> és esetleg a többi ACE<sup>ANAC13</sup> és MRE<sup>ANAC13</sup> elem közösen vesznek

részt különböző transzkripciós faktorok kötésével, melyek még meghatározásra várnak. Az ANAC13 promóter indukálódott a vizsgálatunkban szerepl abszcizinsav és a legtöbb abiotikus környezeti inger, köztük a vörös fény, só és h hatására is. Bemutattuk, hogy a munkánk során azonosított UVBox<sup>ANAC13</sup> cisz-szabályozó elem nem csak szükséges, de elegendő is az UV-B válaszhoz, továbbá igazoltuk, hogy szabályozó funkciója UV-B-re specifikus. Az azonosított szabályozó elemek jó kiindulópontot jelenthetnek a promóterhez specifikusan kapcsolódó fehérjefaktorok, és így az UV-B jelátvitelben résztvevő további elemek felderítéséhez.

## SUMMARY

Ultraviolet (UV) radiation is an important and integral part of sunlight reaching the surface of the Earth. As the stratospheric ozone layer absorbs all radiation under the wavelength of 290 nm, only the higher wavelength portion of UV-B (280-320 nm) and the entire range of UV-A (320-400 nm) radiation reach the surface of the Earth and have biological importance. The detrimental effects of UV-B radiation on living organisms, which can lead to the damage of each essential biomolecule and cell organelle, are well known. Nevertheless, besides being an environmental stress factor, low level UV-B radiation also constitutes an informational signal inducing specific regulatory processes similarly to visible and UV-A light detected by known photoreceptors.

The aim of this study was to provide deeper insight into the molecular mechanisms underlying the UV-B perception and signalling, as well as to elucidate the link between the UV-B pathway and visible light / UV-A-regulated mechanisms. First we analysed transcriptional changes induced by low level UV-B, which provided the necessary information for the identification and characterization of new, potential components of the signalling pathway. On the basis of this preliminary work, we also intended to investigate the role and relation of ANAC13 in UV-B signalling.

We demonstrated that the UV-B response of ANAC13 gene is mainly regulated on transcriptional level. We confirmed and extended the results of former microarray analysis showing that ANAC13 responds to both longer and shorter wavelength UV-B and its transcriptional activity is further induced when exposed to irradiation extended to shorter wavelengths. its UV-B response at transcriptional level is partly independent from known photoreceptors, although our study suggests a role of cryptochromes. In agreement with previous observations, we found that the signalling pathway regulating the expression of ANAC13 is probably independent from the UVR8 pathway.

ANAC13 expression is induced by both UV-B and red light, suggesting that the regulation of this expression is a complex mechanism probably involving different signalling pathways. Analysing the nearly 1,5 kb long promoter region of ANAC13, we identified two MRE and three ACE elements characteristic for photoregulatory elements together with a new cis-regulatory element that we called UVBox<sup>ANAC13</sup>. According to our hypothesis, in order to induce maximal UV-B response the MRE<sup>ANAC13</sup> in the proximal promoter region cooperates with the UVBox<sup>ANAC13</sup> and perhaps with other ACE<sup>ANAC13</sup> and MRE<sup>ANAC13</sup> elements by binding

different transcriptional factors yet to be identified. In our study, the ANAC13 promoter was also induced by abscisic acid and by most abiotic environmental stimuli involving red light, heat and salt. We demonstrated that the UVBox<sup>ANAC13</sup> cis-regulatory element identified in our work is not only necessary but also sufficient for the UV-B response. We also proved that its regulatory function is UV-B specific. The newly identified regulatory elements might constitute a good basis to investigate the different proteins specifically bound to the promoter region together with further elements of the UV-B signalling pathway.



## MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

- A.-H.-Mackerness, S.** (2000): Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress: what are the key regulators? *Plant Growth Reg* **32**, 27-39.
- A.-H.-Mackerness, S., John, C.F., Jordan, B., and Thomas, B.** (2001): Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* **489**, 237-242.
- A.-H.-Mackerness, S., Surplus, S.L., Blake, P., John, C.F., Buchanan-Wollaston, V., Jordan, B.R., and Thomas, B.** (1999): Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* **22**, 1413-1423.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Klimczak, L.J., Landry, L.G., Peng, T., Last, R.L., and Cashmore, A.R.** (1997): An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 199-207.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M.** (1997): Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857.
- Amasino, R. M.** (1986): Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry* **152**, 304-307.
- Ang, L.H., and Deng, X.W.** (1994): Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light-dependent interaction between the HY5 and COP1 loci. *Plant Cell* **6**, 613-628.
- Ang, L.H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., and Deng, X.W.** (1998): Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell* **1**, 213-222.
- Ballare, C.L., Barnes, P.W., and Kendrick, R.E.** (1991): Photomorphogenic effects of UV-B radiation on hypocotyl elongation in wild type and stable-phytochrome-deficient mutant seedlings of cucumber. *Physiol Plant* **83**, 652-658.
- Ballare, C.L., Barnes, P.W., and Flint, S.D.** (1995a): Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. I. The photoreceptor. *Physiol Plant* **93**, 584-592.
- Ballare, C.L., Barnes, P.W., Flint, S.D., and Price, S.** (1995b): Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. II. Time-course, comparison with flavonoid responses and adaptive significance. *Physiol Plant* **93**, 593-601.
- Barnes PW, Flint SD, Caldwell MM.** (1990): Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany* **77**, 1354-1360.
- Beggs, C.J., and Wellmann, E.** (1994): Photocontrol of flavonoid biosynthesis. *Photomorphogenesis in plants*, 2nd ed., R.E. Kendrick and G.H.M. Kronenberg, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 733-751.
- Benfey, PN., Chua, N.H.** (1990): The *Cauliflower Mosaic Virus* 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959-966.

- Bieza, K., and Lois, R.** (2001): An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol* **126**, 1105-1115.
- Björn, L.O.** (1999): UV-B effects: receptors and targets. concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis, G.S. Singhal, G. Renger, S.K. Sopory, K.-D. Irrgang, and Govindjee, eds (New Delhi, India: Narosa Publishing House), pp. 821-832.
- Boccalandro, H.E., Mazza, C.A., Mazzella, M.A., Casal, J.J., and Ballare, C.L.** (2001): Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**, 780-788.
- Bode, A.M., and Dong, Z.** (2003): Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction 10.1126/stke.2003.167.re2. *Sci. STKE* **2003**, re2-.
- Bray, C.M., and West, C.E.** (2005): DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* **168**, 511-528.
- Briggs, W.R., and Christie, J.M.** (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.
- Britt, A.** (2002): Repair of damaged bases. The *Arabidopsis* book, C. Somerville and E. Meyerowitz, eds (American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland) doi: 10.1199/tab.0005, www.aspb.org/publications/arabidopsis/.
- Britt, A., and Fiscus, E.L.** (2003): Growth responses of *Arabidopsis* DNA repair mutants to solar irradiation. *Physiol Plant* **118**, 183-192.
- Britt, A.B.** (2004): Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynth Res* **81**, 105-112.
- Brosche, M., and Strid, A.** (2000): Ultraviolet-B radiation causes tendril coiling in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol* **41**, 1077-1079.
- Brosche, M., and Strid, A.** (2003): Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol Plant* **117**, 1-10.
- Brown, B.A., Jenkins, G.I.** (2008): UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol* **146**, 576-588.
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J., and Jenkins, G.I.** (2005): A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 18225-18230.
- Caldwell, M.M., and Flint, S.D.** (1994): Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change* **28**, 375-394.
- Casati, P., and Walbot, V.** (2004): Crosslinking of ribosomal proteins to RNA in maize ribosomes by UV-B and its effects on translation. *Plant Physiol* **136**, 3319-3332.
- Chen, M., Chory, J., and Fankhauser, C.** (2004): Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**, 87-117.
- Christie, J.M., and Jenkins, G.I.** (1996): Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **8**, 1555-1567.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984): Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995.
- Cloix, C., Jenkins, G.I.** (2008): Interaction of the *Arabidopsis* UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Mol. Plant* **1**, 118-28.

- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cluis, C.P., Mouchel, C.F., and Hardtke, C.S.** (2004): The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J* **38**, 332-347.
- Colligne, M. and Boller, T.** (2001): Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* **46**, 521-529.
- Conklin, P.L., Williams, E.H., and Last, R.L.** (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9970-9974.
- Dasso, M.** (2002): The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* **12**, R502-508.
- Deng, X.-W., and Quail, P.H.** (1992): Genetic and phenotypic characterization of *cop1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **2**, 83-95.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2001): Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**, 159-172.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1997): Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J* **16**, 726-738.
- Duval, M., Hsieh, T.F., Kim, S.Y., Thomas, T.L.** (2002): Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol* **50**, 237-248.
- Eisinger, W.R., Bogomolni, R.A., and Taiz, L.** (2003): Interactions between a blue-green reversible photoreceptor and a separate UV-B receptor in stomatal guard cells. *Am. J. Bot.* **90**, 1560-1566.
- Ensminger, P.A., and Schäfer, E.** (1992): Blue and ultraviolet-B light photoreceptors in parsley cells. *Photochem Photobiol* **55**, 437-447.
- Ernst HA, Olsen AN, Larsen S, Lo Leggio L.** (2004): Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* **5**, 297-303.
- Fábio, T.S., Nogueira, P.S., Schlögl, S.R., Camargo, J.H., Fernandez, V.E., De Rosa, J.** (2005): SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* **169**, 93-106.
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., Seidlitz, H.K., Nagy, F., Ulm, R.** (2009): Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **28**, 591-601.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B.,** (1997): PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J* **11**, 1079-1093.
- Fidantsef, A.L., Mitchell, D.L., and Britt, A.B.** (2000): The *Arabidopsis* UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* **124**, 579-586.
- Friedberg, E.C.** (2001): How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 22-33.
- Frohnmeyer, H., and Staiger, D.** (2003): Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* **133**, 1420-1428.

- Frohnmeier, H., Bowler, C., and Schäfer, E.** (1997): Evidence for some common signal transduction events involved in UV B light-dependent responses in parsley protoplasts. *J Exp Bot* **48**, 739-750.
- Frohnmeier, H., Loyall, L., Blatt, M.R., and Grabov, A.** (1999): Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J* **20**, 109-117.
- Frohnmeier, H., Bowler, C., Zhu, J.-k., Yamagata, H., Schafer, E., and Chua, N.-h.** (1998): Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome and UV regulated expression of chalcone synthase. *The Plant Journal* **13**, 763-772.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kazuo Shinozaki** (2004): A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* **39**, 863-876.
- Galland, P., and Senger, H.** (1988a): The role of flavins as photoreceptors. *J Photochem Photobiol B: Biol* **121**, 277-294.
- Galland, P., and Senger, H.** (1988b): The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants. *Photochem Photobiol* **48**, 811-820.
- Gechev, T.S., Gadjiev, I.Z., Hille, J.** (2004): An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1185-1197.
- Greve, K., La Cour, T., Jensen, M.K., Poulsen, F.M., Skriver, K.** (2003): Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochem J* **371**, 97-108.
- Gyula, P., Schafer, E., and Nagy, F.** (2003): Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 446-452.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hardtke, C.S., and Deng, X.W.** (2000): The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol* **124**, 1548-1557.
- Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrtens, F., Stracke, R., Weisshaar, B.** (2005): Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol* **57**, 155-171.
- Hartmann, U., Valentine, W.J., Christie, J.M., Hays, J., Jenkins, G.I., Weisshaar, B.** (1998): Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. *Plant Mol Biol* **36**, 741-754.
- Hayama, R., Izawa, T., Shimamoto, K.** (2002): Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* **43**, 494-504.
- Hefner, E., Preuss, S.B., and Britt, A.B.** (2003): *Arabidopsis* mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* **54**, 669-680.
- Heged s, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Park, I., Whitwill, S., Lydiate, D.** (2003): Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* **53**, 383-397.

- Hennig, L., Gruissem W, Grossniklaus U, Köhler C.** (2004): Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**, 1765-1775.
- Hideg, E., Barta, C., Kalai, T., Vass, I., Hideg, K., and Asada, K.** (2002): Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol* **43**, 1154-1164.
- Holley, S.R., Yalamanchili, R.D., Moura, D.S., Ryan, C.A., and Stratmann, J.W.** (2003): Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Physiol* **132**, 1728-1738.
- Holm, M., Hardtke, C.S., Gaudet, R., and Deng, X.W.** (2001): Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *Embo J* **20**, 118-127.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W.** (2002): Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **16**, 1247-1259.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafe, M.K., Tingey, S.V., Chua, N.H.** (2002): Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abil-1* mutant. *J. Cell Sci* **115**, 4891-4900.
- Hu, W., Wang, Y., Bowers, C., Ma, H.** (2003). Isolation, sequence analysis, and expression studies of florally expressed cDNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol* **53**, 545-563.
- Hudson, M.E.** (2000): The genetics of phytochrome signalling in *Arabidopsis*. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 475-483.
- Hunt, S., Cuthill, I.C., Bennett, A.T., Church, S.C., and Partridge, J.C.** (2001): Is the ultraviolet waveband a special communication channel in avian mate choice? *J Exp Biol* **204**, 2499-2507.
- Izaguirre, M.M., Scopel, A.L., Baldwin, I.T., Ballaré, C.L.** (2003): Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiol* **132**, 1755-1767.
- Jackson, J.A., Fuglevand, G., Brown, B.A., Shaw, M.J., and Jenkins, G.I.** (1995): Isolation of *Arabidopsis* mutants altered in the light-regulation of chalcone synthase gene expression using a transgenic screening approach. *The Plant Journal* **8**, 369-380.
- Jang, I.C., Yang, J.Y., Seo, H.S., and Chua, N.H.** (2005): HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev* **19**, 593-602.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.W., Valverde, F., Coupland, G.** (2008): *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J* **8**, 1277-88.
- Jenkins, G.I.** (2009): Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 407-431.
- Jenkins, G.I., Long, J.C., Wade, H.K., Shenton, M.R., and Bibikova, T.N.** (2001): UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol* **151**, 121-131.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W.** (2007): Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**, 217-230.

- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E., and Deng, X.W.** (2005): Conservation and divergence of lightregulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3239-3256.
- Jiao, Y., Yang, H., Ma, L., Sun, N., Yu, H., Liu, T., Gao, Y., Gu, H., Chen, Z., Wada, M., Gerstein, M., Zhao, H., Qu, L.J., Deng, X.W.** (2003): A genome-wide analysis of blue-light regulation of *Arabidopsis* transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol* **133**, 1480-1493.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrstens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000): Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Embo J* **19**, 6150-6161.
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A., Grierson, D.** (1997): Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol Biol* **33**, 641-651.
- Kaiser, T., Emmler, K., Kretsch, T., Weisshaar, B., Schäfer, E., Batschauer, A.** (1995): Promoter elements of the mustard CHS1 gene are sufficient for light regulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **28**, 219-229.
- Kaiserli, E., Jenkins, G.I.** (2007): UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *Plant Cell* **19**, 2662-73.
- Kalbin, G., Hidema, J., Brosche, M., Kumagai, T., Bornman, J.F., and Strid, A.** (2001): UVB-induced DNA damage and expression of defence genes under UV-B stress: tissuespecific molecular marker analysis in leaves. *Plant Cell Environ* **24**, 983-990.
- Kevan, P.G., Chittka, L., and Dyer, A.G.** (2001): Limits to the salience of ultraviolet: lessons from colour vision in bees and birds. *J Exp Biol* **204**, 2571-2580.
- Kikuchi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Yoshida, K.T., Nagato, Y., Matsusoka, M., Hirano, H.Y.** (2000): Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol Gen Genet* **262**, 1047-1051.
- Kim, B.C., Tennessen, D.J., and Last, R.L.** (1998). UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**, 667-674.
- Kleine, T., Lockhart, P., Batschauer, A.** (2003): An *Arabidopsis* protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* **35**, 93-103.
- Kliebenstein, D.J., Lim, J.E., Landry, L.G., and Last, R.L.** (2002): *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol* **130**, 234-243.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., and Schell, J.** (1994): Specialized vectors for gene tagging and expression studies. *Plant Molecular Biology Manual*, B.S. Gelvin and R.A. Schilperroot, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher), pp. 1-22.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* **97**, 2940-2945.
- Kucera, B., Leubner-Metzger, G., and Wellmann, E.** (2003): Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with {beta}-1,3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. *Plant Physiol* **133**, 1445-1452.
- Kuhlmann F., Müller C.** (2009): Independent responses to ultraviolet radiation and herbivore attack in broccoli. *Journal of Experimental Botany* **12**, 3467-3475.

- Landry, L.G., Chapple, C.C., and Last, R.L.** (1995): *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**, 1159-1166.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., Traas, J.** (2004): MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* **131**, 4311-4322.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L.** (1993): *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Lim, M.L.M., Land, M.F., and Li, D.** (2007): Sex-specific UV and fluorescence signals in jumping spiders. *Science* **315**, 481.
- Lin, J.F., and Wu, S.H.** (2004): Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **39**, 612-628.
- Lin, C., and Shalitin, D.** (2003): Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 469-496.
- Liscum, E., Hodgson, D.W., and Campbell, T.J.** (2003): Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiol.* **133**, 1429-1436.
- Liu, Z., Hossain, G.S., Islas-Osuna, M.A., Mitchell, D.L., and Mount, D.W.** (2000): Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *Plant J* **21**, 519-528.
- Liu, Z., Hong, S.W., Escobar, M., Vierling, E., Mitchell, D.L., Mount, D.W., and Hall, J.D.** (2003): *Arabidopsis* UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol* **132**, 1405-1414.
- Lois, R.** (1994): Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* **194**, 498-503.
- Logemann, E., Hahlbrock, K.** (2002): Crosstalk among stress responses in plants: pathogen defense overrides UV protection through an inversely regulated ACE/ACE type of light-responsive gene promoter unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2428-2432.
- Lu, P.L., Chen, N.Z., An, R., Su, Z., Qi, B.S., Ren, F., Chen, J. and Wang, X.C.** (2007): A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol* **63**, 289-305.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., and Deng, X.W.** (2001): Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589-2607.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., and Deng, X.W.** (2002): Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2383-2398.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N.** (1997): Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci* **2**, 390-396.
- Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P., Bartel, B.** (2004): MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative and floral organs. *Curr Biol* **14**, 1035-1046.
- Mazza, C.A., Boccalandro, H.E., Giordano, C.V., Battista, D., Scopel, A.L., and Ballare, C.L.** (2000): Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol* **122**, 117-126.

- McKenzie, R.L., Bjorn, L.O., Bais, A., and Ilyasd, M.** (2003): Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* **2**, 5-15.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., and Weisshaar, B.** (2005): The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 1083-1096.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., and Ellis, B.E.** (2002): Suramin inhibits oxidant signalling in tobacco suspension-cultured cells. *Plant, Cell & Environment* **25**, 521-527.
- Murashige, T.; Skoog, F.A.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**. p.473-497.
- Nagy, F., and Schafer, E.** (2002): Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 329-355.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S.T., Jiang, C.Z., Todo, T., Britt, A.B., and Yamamoto, K.** (1998): Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **26**, 638-644.
- Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000): Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DREbinding proteins involved in dehydration- and high-salinityresponsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* **42**, 657-665.
- Nemhauser, J., Chory, J.** (2002): Photomorphogenesis. The *Arabidopsis* book, C. Somerville and E. Meyerowitz, eds (American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland) doi: 10.1199/tab.0054
- Nogueira, T.S., Schlögl, P.S., Camargo, S.R., Fernandez, J.H., De Rosa, W.E., Pompermayer-P. and Arruda, P.** (2004): SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* **169**, 93-106.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Lo Leggio, L., Johansson, E., Larsen, S., Skriver, K.** (2004): Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallogr D Biol* **60**, 112-115.
- Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, M., Fujita, M., Satoh, R., Satou, M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2003): Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* **34**, 868-887.
- Oravecz, A., Baumann, A., Mate, Z., Brzezinska, A., Molinier, J., Oakeley, E.J., Adam, E., Schafer, E., Nagy, F., and Ulm, R.** (2006): CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1975-1990.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W.** (2000): Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**, 462-466.
- Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K.** (1997): The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* **11**, 2983-2995.
- Paul, N. D., Gwynn-Jones, D.** (2003): Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol Evol* **18**, 48-55.



- Quail, P.H.** (2002a): Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **14**, 180-188.
- Quail, P.H.** (2002b): Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 85-93.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003): Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* **133**, 1755-1767.
- Ren, T., Qu, F., Morris, T.J.** (2000): HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* **12**, 1917-1925.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G.** (2000): *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-10.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K., and Hohn, B.** (2000): Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**, 98-101.
- Robertson, M.** (2004): Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone. *Plant Physiol* **136**, 1-15.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L.O., and Caldwell, M.** (1997): UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol Evol* **12**, 22-28.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J.** (1999): Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4311-4322.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006): Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18822-18827.
- Sambrook, J., and Russel, D.W.** (2001): *Molecular cloning* (Cold Spring Harbour, New York: CSHL Press).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. A.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancar, A.** (2003): Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S.** (2004): Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39-85.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Manners, J.M., Anderson, J.P., Simpson, R.S., Wilson, I.W., Somerville, S.C., Meehan, D.J.** (2003): Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol* **132**, 999-1010.
- Schuermann, D., Molinier, J., Fritsch, O., and Hohn, B.** (2005): The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* **21**, 172-181.
- Schulze-Lefert, P., Dangl ,J.L., Becker-André, M., Hahlbrock ,K., Schulz, W.** (1989): *EMBO J* **8**, 651-656.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.,**

- Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K.** (2002): Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**, 279-292.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A., and Chua, N.H.** (2004): Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev* **18**, 617-622.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., and Chua, N.H.** (2003): LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **424**, 995-999.
- Shinkle, J.R., Atkins, A.K., Humphrey, E.E., Rodgers, C.W., Wheeler, S.L., and Barnes, P.W.** (2004): Growth and morphological responses to different UV wavebands in cucumber (*Cucumis sativum*) and other dicotyledonous seedlings. *Physiol Plant* **120**, 240-248.
- Sholpan, Davletova., Karen, Schlauch., Jesse, Coutu., and Ron Mittler** (2005): The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **10**, 1104/ pp.105.068254.
- Slablowsky, R.W.M. and Meyerowitz, E.M.** (1998): A homolog of No Apical Meristem is an immediate target of the floral homeotic genes APETAL3/PISTILLATA. *Cell* **92**, 93-103.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Koes, R.** (1996): The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-170
- Stratmann, J.** (2003): Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends Plant Sci* **8**, 526-533.
- Stratmann, J.W., Stelmach, B.A., Weiler, E.W., and Ryan, C.A.** (2000): UVB/UVA radiation activates a 48 kDa myelin basic protein kinase and potentiates wound signaling in tomato leaves. *Photochem Photobiol* **71**, 116-123.
- Suesslin, C., and Frohnmeyer, H.** (2003): An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J* **33**, 591-601.
- Surplus, S.L., Jordan, B.R., Murphy, A.M., Carr, J.P., Thomas, B., and A-H-Mackerness, S.** (1998): UV-B induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and ROS in the regulation of transcripts and acidic PR proteins. *Plant Cell Environ* **21**, 685-694.
- Tanaka, A., Sakamoto, A., Ishigaki, Y., Nikaido, O., Sun, G., Hase, Y., Shikazono, N., Tano, S., and Watanabe, H.** (2002): An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 64-71.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., and Quail, P.H.** (2001): Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9437-9442.
- Tovee, M.J.** (1995): Ultra-violet photoreceptors in the animal kingdom: their distribution and function. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 455-460.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., 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**, 2481-2498.

- Ulm, R.** (2003): Molecular genetics of genotoxic stress signalling in plants. Topics in Current Genetics, (Vol 4) Plant responses to abiotic stress, H. Hirt and K. Shinozaki, eds (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg).
- Ulm, R.** (2006): UV-B perception and signalling in higher plants. Photomorphogenesis in Plants and Bacteria, 3rd ed., E. Schäfer and F. Nagy, eds (Springer, Dordrecht), pp. 279-304.
- Ulm, R., Nagy, F.** (2005): Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 477-482.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., and Paszkowski, J.** (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *Embo J* **21**, 6483-6493.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Mate, Z., Adam, E., Oakeley, E.J., Schafer, E., and Nagy, F.** (2004): Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1397-1402.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.** (2004): Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **39**, 45-58.
- van de Staaij JW, Tonneijck AE, Rosema J.** (1997): The effect of reciprocal treatments with ozone and ultraviolet-B radiation on photosynthesis and growth of perennial grass *Elymus athericus*. *Environ pollut* **97**(3):281-6.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Montagu, M. van, Schell, J.** (1975): Characterization of different plaque-forming and defective temperature phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* **26**. p. 33-48.
- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A., de Vries, S.C.** (2003): The CUP\_SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.
- Wade, H.K., Sohal, A.K., and Jenkins, G.I.** (2003): *Arabidopsis* ICX1 is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. *Plant Physiol* **131**, 707-715.
- Wade, H.K., Bibikova, T.N., Valentine, W.J., and Jenkins, G.I.** (2001): Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant J* **25**, 675-685.
- Wang, X., Basnayake, B.M., Zhang, H., Li, G., Li, W., Virk, N., Mengiste T., Song, F.** (2009): The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 1227-1238.
- Wang, H., and Deng, X.W.** (2002): Phytochrome Signaling Mechanism. The *Arabidopsis* book, C. Somerville and E. Meyerowitz, eds (American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland) doi: 10.1199/tab.0074.1, [www.aspb.org/publications/arabidopsis/](http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/).
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Deng, X.W.** (2001): Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* **294**, 154-158.
- Waterworth, W.M., Jiang, Q., West, C.E., Nikaido, M., and Bray, C.M.** (2002): Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* **53**, 1005-1015.

- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K.** (1991): Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J* **10**, 1777-1786.
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., Meyerowitz, E.M.** (2004): Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **16**, 1314-1326.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., and Durner, J.** (2001): Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 177-183.
- Wilson, M.I., and Greenberg, B.M.** (1993): Specificity and photomorphogenic nature of ultraviolet-B-induced cotyledon curling in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* **102**, 671-677.
- Winkel-Shirley, B.** (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 218-223.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N.H.** (2000): *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* **14**, 3024-3036.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A. and Gutierrez, C.** (1999): Grab proteins novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol Biol* **39**, 647-656.
- Yang, H.Q., Tang, R.H., and Cashmore, A.R.** (2001): The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* **13**, 2573-2587.
- Yi, C., Dedg, X.W.** (2005): COP1-from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **15**, 618-625.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K.** (2001): Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol* **42**, 1012-1016.

## M2. Táblázatok

1. táblázat. A kísérletekben felhasznált plazmidok jegyzéke

plazmid neve	forrása	jellemz je
pBluescriptII KS/ SK	Sratogene, La Jolla, USA	<i>E. coli</i> klónozó vektor
pPCV/Luc+NOS	Koncz, 1994	Bináris növénytranszformációs vektor

2. táblázat. A kísérletekben felhasznált klónok jegyzéke

A klón neve	vektor	inszert
ANAC13FL	pPCV/Luc	ANAC13 61454-+25, BglII-BamHI
ANAC13DEL1(1)	pPCV/Luc	ANAC136198-+25, BglII-BamHI
ANAC13DEL2(2)	pPCV/Luc	ANAC13 6146-+25, BglII-BamHI
ANAC13DEL3(3)	pPCV/Luc	ANAC13 6110-+25, SalI-BamHI
pPCV35Smin	pPCV/Luc	35S promóter 646-+6, SalI-BamHI
ANAC13WT 110	pPCV35Smin/Luc	ANAC13 61454--110, Sal-BglII
ANAC13MRE	pPCV35Smin/Luc	ANAC13 61454--110, MRE-box mutáció
ANAC13MRE-ACE	pPCV35Smin/Luc	ANAC13 61454--110, MRE-ACE-box mutáció
ANAC13UP	pPCV35Smin/Luc	ANAC13 61454--146, SalI-BglII
2xUVBox	pPCV35Smin/Luc	ANAC13, oligó, -1186 102, EcoRI-SalI
UVBox mut1,2	pPCVNAM-L FL	QuikChange mutagenézis módszerrel

3. táblázat. A kísérletekben felhasznált primerek jegyzéke

primer neve	szekvencia	technika / klón
CDK6_for	5øGTCTTCTTCAAGCCAGGTGATA 3ø	RT-PCR
CDK6_rev	5øAAGCCGATCTTTAGGGTCATA 3ø	RT-PCR
ANAC13_for	5øCTGAGGAATTACCTGAGAAAGC 3ø	RT-PCR
ANAC13_rev	5øAATATGAATCAGCACCAACGA 3ø	RT-PCR
HY5_for	5øTGGAGATCAAAGAAGGAATTGA 3ø	RT-PCR
HY5_rev	5øAGGCTTGCATCAGCATTAGA 3ø	RT-PCR
LUC_for	5øTCATAGAACTGCCCTGCGTGAG 3ø	RT-PCR
LUC_rev	5øAATGTAGCCATCCATCCTTGT 3ø	RT-PCR
ANAC13Qup	5øCCAAACCTTCTTCTCCAATGAAAAACACC 3ø	QuikChange
ANAC13Qlo	5øGGTGTTTTTTCATTGGAGAAGAAGGTTTGG 3ø	QuikChange
2xUVBoxup	5øAATTCTTCTTCTCCAAGGAAAATTCTTCTCCAAG GAAAAG 3ø	2xUVBox
2xUVBoxlo	5øTCGACTTTTCCTTGGAGAAGAATTTTCCTTGGAG AAGAAG 3ø	2xUVBox
ANAC13Pr_for1	5øGAAGATCTATTGTGTCGACGTACG 3ø	ANAC13 FL (1)
ANAC13Pr_rev1	5øCGGGATCCTCACTTTTTTCTCTCTCG 3ø	ANAC13 FL (1)
ANAC13forSalk	5øGAAGATCTGAAAATAACAATTAATGAAATG 3ø	ANAC13-198- +24(2)
ANAC13box.for	5øGAAGATCTGCTACGTGTCGTCTCTGT 3ø	ANAC13-147- +24(3)
ANAC13110for	5øCCGGTCGACAAGGAAAAACACCAA 3ø	ANAC13-110- +24(4)
ANAC13-147rev	5øATCTTTGTTTGCGGAATTATTTTAC 3ø	ANAC13UP(5)
150-110wt	5øTCGAGGAGAAGAAGGTTTGGCTTACAGAGACGA CACGTAGCATCT3ø	WT -110
150-110MRE	5øTCGAGGAGAAGACTAGCGCACTTACAGAGACGA CACGTAGCATCT3ø	MREmut
150-110MRE-ACE	5øTCGAGGAGAAGACTAGCGCACTTACAGAGACGA CCAGGAGCATCT3ø	MRE-ACEmut
Luc seq	5øCTGGAAGATGGAACCGCT 3ø	szekvenáló primer
LB seq	5øCCGAAAAGTGCCACCTGA 3ø	szekvenáló primer
T3	5øATTAACCCTCACTAAAGGGAAC 3ø	szekvenáló primer
T7	5øAATACGACTCACTATAGGGCG 3ø	szekvenáló primer
LBfor1	5øGTG GCG AAA CCC GAC AGG AC 3'	Southern analízis
LBrev1	5øAGG CGG ATA AAG TTG CAG GAC CAC 3ø	Southern analízis

<b>primer neve</b>	<b>szekvencia</b>	<b>technika / klón</b>
RBfor1	5'CGC AAG GAA TCG GTC AAT ACA CTA 3'	Southern analízis
RBrev1	5'GGG GCG TCG GTT TCC ACT A 3'	Southern analízis
LucplusInv	5'GAT GTC CAC CTC GAT ATG TGC ATC TGT AAA AGC 3'	Inverz PCR
HygILA-up1	5'CGA TAG AAA ACA AAA TAT AGC GCG CAA ACT AGG A 3'	Inverz PCR
Lb21	5'GTG AAG TTT CTC ATC TAA GCC CCC ATT T 3'	Inverz PCR
PBR1	5'CAC ATT TCC CCG AAA AGT GCC ACC TGA 3'	Inverz PCR

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezet mnek, *Dr. Dallmann Gézának*, aki lehet vé tette doktori dolgozatom elkészítését a Mező gazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban. Széleskörű szakmai ismereteivel, gyakorlati tapasztalataival és hasznos tanácsaival mindvégig irányította és segítette munkámat. Köszönöm a munkám elvégzéséhez biztosított kiváló laboratóriumi körülményeket, a sok türelmet, valamint a nyugodt háttérrel.

Köszönettel tartozom csoportvezet mnek, *Dr. Nagy Ferencnek* jelentős anyagi és szellemi támogatásáért, mellyel mindvégig segítette munkámat.

Köszönöm *Dr. Bisztray György Dénesnek*, aki kiváló szakmai tapasztalata és kapcsolatai révén elindította és mindvégig támogatta szakterületem, majd doktori dolgozatom elkészítését a Mező gazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban.

Köszönöm *Dr. Pedryc Andrzejnek* a képzés és a doktori eljárás lebonyolítása során nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Máté Zoltánnak* értékes szakmai tanácsait és támogatását. Külön köszönöm a labor további tagjainak: *Haász Veronikának*, *Simon Ildikónak*, *Nádudvariné Novák Júliának* segítségét és kedvességét, valamint a kísérletek során felmerülő feladatokban nyújtott precíz segítségét.

Ezúton köszönném meg valamennyi korábbi munkatársamnak, köztük az MBK Növényvirologiai csoportjának, valamint *Dr. Sós-Hegedűs Anitának* a molekuláris biológiai módszerek elsajátításában nyújtott nagy értékű gyakorlati segítségét.