

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Sáfrány Judit



Budapest

2011

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem
Kertészettudományi Kar
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Bisztray György Dénes
egyetemi docens, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem
Szőlészeti és Borászati Intézet
Szőlészeti Tanszék

Külső konzulens: Dr. Dallmann Géza
biológiai tudományok kandidátusa,
tudományos főmunkatárs
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Gödöllő
Búza Genetika Csoport

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Földünk nélkülözhetetlen energiaforrása a fény. A Naptól 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/Ultraibolya-B) sugárzás a Nap elektromágneses sugárzásának egyik lényeges része. A növényeknek fényfüggő életmódjuk és helyhez kötött életformájuk következtében elkerülhetetlenül számolniuk kell az őket érő UV-B sugárzással. A nagy intenzitású UV sugárzás különböző stresszválaszokat válthat ki, 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 nagyjából 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 eredmény azután további alapot nyújthat az UV-B válasz lehetséges, új komponenseinek feltárásához, és az UV-B és látható fény által irányított jelátviteli folyamatok összehasonlításához.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi anyag és mikroorganizmusok

Ezen munka során három vad *Arabidopsis thaliana* ökotípust (*Columbia* [Col], *Landsberg erecta* [Ler] és *Wassilewskija* [Ws]), illetve ezek különböző, nyilvánosan hozzáférhető mutáns változatait használtuk. Az *Echerichia coli* DH5 α törzset különféle klónozási célokra, míg az S17-1 törzset az *Agrobacterium* konjugációjára használtuk. Növények transzformálására az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzset használtuk.

Növények nevelése

Az *A. thaliana* növények magvait felhasználásig sötétben, 4°C-on tároltuk. A magvakat COMPO SANA típusú virágföld felszínére vetettük. Tavasztól őszi terjedő időszakban mesterséges megvilágítás alkalmazása nélkül, üvegházban, míg a téli időszakban, fitotronban, (12/12h fény/sötét fotoperiódus, 80% relatív páratartalom és 23 \pm 2°C) mellett neveltük a növényanyagot. A transzformációhoz 8-10 hetes korban, virágos állapotban használtuk fel őket. A transzformált növényekről származó magok felületét aratást követően sterilizáltuk, majd MS táptalajra szélesztettük őket. A lemezeket a csírázás elősegítése érdekében két napra 4°C-ra helyeztük, majd a csíráztatás 23°C-on, hosszúnappal körülmények között, növénynevelő kamrában folyt 6 napig. Az UV-B kezelésre a 7. napon került sor. A vörös fénykezeléshez a magok sterilizálás után két napra 4°C-ra kerültek, és a csíráztatás már a mérésre használt 96 lyukas

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros folyóiratok

Safrany, J., Haasz, V., Mate, Z., Cioffi, A., Feher, B., Oravec, A., Srec, A., Dallmann, G., Morelli, G., Ulm, R., Nagy, F. (2008): Identification of a novel cis-regulatory element for UV-B-induced transcription in *Arabidopsis*, *The Plant Journal* 54, 402-414

Angol nyelvű konferencia-összefoglalók

Safrany J., Haasz V., Dallmann G. Critical promoter elements in UV-B induced expression of ANAC13. *Plant Abiotic Stress – from signaling to development*, 2nd meeting of the INPAS, 14-17 May 2009 Tartu, Estonia p. 111.

Magyar nyelvű konferenciakiadványok (full paper)

Sáfrány J, Haász V, Máté Z, Dallmann G, UV-B érzékelés és jelátvitel növényekben. Keszthely, Ifjúsági Tudományos Fórum, 2007. március 22. Konferencia-kiadvány: CD, 5 oldal

Sáfrány J, Haász V, Máté Z, Az UV-B jelátvitelben meghatározó szerepű promóter elem azonosítása pontmutánsok segítségével *Arabidopsis thaliana*-ban. Kecskemét, 2007. augusztus 27-28. Erdei Ferenc Konferencia, II. kötet, p. 951-954.

Haász V, Sáfrány J, Dallmann G, UV-B válaszban résztvevő promóter elemek azonosítása az *Arabidopsis* HY5 génjében. Budapest, Tavasz Szél Konferencia, 2007. május 17-19. p. 213-218.

Magyar nyelvű összefoglalók

Sáfrány J, Haász V, Máté Z, Dallmann G, Nagy F, UV-B indukálta génválaszban szerepet játszó promóter elemek azonosítása *Arabidopsis thaliana*-ban. Balatonfüred, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. 2007. április 15-17. p. 160-161.

Sáfrány J, Máté Z, Dallmann G, A NAM transzkripció faktor UV-B válaszban betöltött szerepének jellemzése *Arabidopsis thaliana*-ban. "Lippai János-Ormos Imre-Vas Károly" Tudományos Ülésszak, 2007. November 7-8. Összefoglalók p. 132-133.

Sáfrány J, Haász V, Máté Z, Dallmann G, Az ANAC13 gén ultraviola-B válaszban szerepet játszó promoterelemei, Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, 2009. október 28–30. Budapest, Összefoglaló p. 58-59.

UV-B válasszal ruházza fel. Meghatároztuk, hogy az UVBox^{ANAC13} szabályozó funkciója UV-B-re specifikus, a Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc transzgén expressziója nem érintett más, a kísérleteinkben felhasznált biotikus és abiotikus ingerek által, szemben a Pro_{ANAC13}::Luc és Pro_{DREB2A}::Luc konstrukciókkal. Mindez azt jelenti, hogy az UVBox^{ANAC13} egy specifikus cisz-elemként működik az UV-B indukálta transzkripció közvetítésében.

mikrotiter lemezben történt sötétben, 4 napig, 23°C-on. A vörös fénykezelésre az 5. napon került sor.

***Arabidopsis thaliana* transzformáció, transzgénikus növények előállítása**

A "virágzatmerítés" módszerét használtuk az *Arabidopsis* növények transzformálására. A transzformált növények szelekciójához higromicin rezisztenciát biztosító bináris vektorokat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzset alkalmaztuk. Az elsődleges transzformánsokat a rezisztencia alapján szelektáltuk.

Abiotikus és biotikus stresszkezelések körülményei, és a luciferáz-aktivitás mérése

UV-B és kvarc kezeléshez a hat napos csíranövényeket 96 lyukú mikrotiter lemezbe helyeztük, amelyek lyukanként 200 µl MS táptalajt tartalmaztak. A növényekre 20 µl, 2 mM D-luciferin oldatot mértünk. 7 napos korban végeztük a fénykezeléseket. A luciferáz gént hordozó növények kezelés hatására bekövetkező lumineszcencia változását TopCount™ automata luminométeren mérve követtük. UV-B (25 perc) és kvarc (15 perc) kezeléshez fényforrásként 8 darab Philips TL 40W/12 UV fénycsövet tartalmazó lámpát használtunk. A spektrum megfelelő tartományának kiszűréséhez a fényforrás és a mikrotiter lemez közé 3 mm-es vastagságú transzmissziós alulvágó filtert használtunk (WG305, kvarc). A vörös fény kísérletekhez a 4 napig nevelt etiolált csíranövényeket 1 napig luciferinben pre-inkubáltuk, majd az 5. napon vörös fényvel megvilágítottuk. A vörös kezeléshez (60 perc) 936 db, vörös fényt emittáló diódából felépülő fényforrást használtunk. A hormonkezeléshez 100 µM koncentrációjú ABA oldatot, sóstresszhez 250 mM NaCl oldatot, ozmotikus stresszhez pedig 100 mM mannitolt mértünk a csíranövényekre. A hőstresszhez a csíranövényeket 6 órára 37°C-ra, míg a hidegstresszhez ugyanilyen időtartamra 4°C-ra helyeztük.

Molekuláris biológiai módszerek

A nukleinsavak izolálása és manipulálása (plazmid DNS tisztítás, növényi DNS izolálás, RNS kivonás, restrikciós endonukleáz emésztés, elektroforetikus

elválasztás, DNS fragmentum izolálás, polimeráz láncreakció, Southern-analízis, RNS-analízis, szekvenálás), az *E. coli* transzformálása és az *A. tumefaciens* konjugációja, irányított pontmutáció létrehozása, az irodalomban szereplő technikáknak és a különböző gyártók javaslatainak megfelelően kerültek kivitelezésre.

EMS mutagenézis

Körülbelül 1 g (~50 000 db) magot, vernalizálást követően pár órára vízben előáztattuk, majd etilmetán-szulfonát 0,2 %-os oldatában gyengén ráztunk 12 órán át. A kezelést követően a magokat bő vízmennyiséggel átmostuk, majd nagy mennyiségű vízben felvéve, 800 cserép föld felszínére egyenletesen kivetítettük. A learatott 800 cserép növényt 800 külön csoportként kezeltük és szűrtük. Csoportonként körülbelül 150-200 magot szélesztettünk ki MS táptalajra. A csírázás átlagosan 50%-os volt, így csoportonként körülbelül 100 csíranövény luciferáz aktivitását mértük meg. A mérést TopCount™ 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.

EREDMÉNYEK

Munkánk előzményeként korábban beszámoltak az UV-B kezelésnek kitétt, fehér fényben nevelt, 7 napos *Wassilewskija* (Ws) ökotípusú *Arabidopsis thaliana* csíranövények teljes genom microarray analíziséről. 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 represszálódott.

Az UV-B által indukált transzkripcionális változások vizsgálata

A microarray analízis eredményei alapján az alacsony intenzitású UV-B-re választ adó gének közül kiválasztottuk a 10 legmagasabb indukciót mutató gént.

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^{ANAC13}::Luc UV-B indukcióját. Ez az újonnan meghatározott szabályozó elem, melyet UVBox^{ANAC13} jelöléssel láttunk el, egy jelentősebb cisz-szabályozó elem az ANAC13 promóter UV-B válaszában irányításában. Azt a hipotézist preferáljuk, miszerint 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 transzkripció faktorok kötésével, melyek még meghatározásra várnak. Bemutattuk, hogy az UVBox^{ANAC13} 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^{ANAC013} 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^{ANAC13} és MRE^{ANAC13} egységek együttes hatásából származik.

A fény és más környezeti szignálok gyakran közösen vesznek részt egy-egy specifikus fejlődési válasz közvetítésében, mely jelzi ezek között a jelátviteli utak közötti kapcsolódási pontok meglétét. Az UV-B indukálta jelátviteli hálózat igazoltan átfed a sebzés válasz jelátvitelével. A fenilpropanoidok nagy része fényszűrőként funkcionál, és/vagy elhárítja a rovarátmadásokat. A microarray analízisek során nagy számban azonosítottak olyan UV-B választ adó géneket, melyek más stresszfaktorokra is indukálódnak. A NAC domain protein család számos tagja is egyszerre több abiotikus és biotikus stressz jelátviteli folyamat szereplője. Ebből adódóan feltehetőleg reguláló faktorok egész seregére lehet szükség bizonyos gének megfelelő szabályozásához. A gének indukciójának megértéséhez fontos lenne tudni, hogy vajon a különböző ingerek a transzkripciót elkülönült vagy közös cisz-elemeken keresztül aktiválják-e. Az ANAC13 promóter indukálódik a vizsgálatunkban szereplő abszcizinsav, és a legtöbb abiotikus környezeti inger, köztük a vörös fény, só és hő hatására is. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az ép UVBox^{ANAC13}, legalábbis dimer formában, elegendő ahhoz, hogy a Pro^{35Smin}::Luc promóter konstrukciót

összevetve. Ez azt sugallja, hogy az ANAC13 expressziója komplex, feltehetően különböző jelátviteli utak által szabályozott.

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 részvételével történnek. Ezek a fényszabályozó elemek az *Arabidopsis thaliana*-ban két különböző típusú cisz-regulátor elemet tartalmaznak: a bZIP-kötő ACE és az MRE típusú elemeket. 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^{CHS} és három ACE^{CHS} típusú elemet, melyek közül négy, a vizsgált promóterekben tapasztaltakhoz hasonlóan párban helyezkedik el. 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 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^{ANAC13} szabályozó elemet (-146-től -110-ig). Ezen felül a vizsgált promóter vörös fény indukciója ugyancsak két régióhoz köthető. 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, 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.

Elindítottunk egy luciferáz riportter gén alapú genetikai szűrővizsgálatot *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^{ANAC13}::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

Ahhoz, hogy meghatározzuk, ezen gének UV-B indukált expressziója transzkripció szinten, avagy mRNS stabilitás szintjén szabályozott, a transzkripció aktivitás markereként használt luciferáz riportter rendszert használtuk fel. Ebben az *in vivo* vizsgálati rendszerben a kiválasztott gének promóter régiójának megközelítőleg 1.5 kb. hosszúságú fragmentjét hozzákapsoltuk a luciferáz (Luc) riportter génhez, majd ezekkel a konstrukciókkal transzformált *Arabidopsis* növényeket vetettük vizsgálat alá. A hosszúnappalos körülmények között nevelt, 7 napos transzgenikus növényeket polikromatikus UV-B sugárzásnak tettük ki, majd a luciferáz riportter gén aktivitását automata luminométeren mértük. A mérések alapján kitűnik, hogy a nagyobb hullámhosszú UV-B sugárzás gyors expressziós változást indukál a Pro^{HYS}, Pro^{ELIP2}, Pro^{At5g52250} és a Pro^{ANAC13} promóterek esetében, míg a szűrtlen UV-B hatására a Pro^{ZAT12}, Pro^{UGT72C1} és a Pro^{ANAC13} promóterek transzkripció aktivitása növekszik. Feltűnő, hogy a Pro^{ANAC13} közel azonos expressziós mintázatot és szintet mutat a hosszabb hullámhosszú, és a szűrtlen UV-B alatt is.

Az ANAC13 gén korai UV-B válaszáinak spektrális függése

A kirajzolódó expressziós mintázata alapján a tíz kiválasztott UV-B választ adó gén közül az ANAC13-mal végeztünk további kísérleteket. Az ANAC13 az átlagosnál magasabb UV-B indukciót mutatott, illetve felkeltette érdeklődésünket, hogy mindkét vizsgált spektrum esetében szinte azonos mértékű indukciót mértünk. A kiválasztásnál az is szerepet játszott, hogy egy új elemet vizsgáljunk. Az UV kezelés során 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 (szűrtlen, erős UV-B). A mintákból Northern-analízishez teljes RNS-t izoláltunk. A transzkriptum felhalmozódása a WG305, WG295 és kvarckezeléseknél magasabb, mint a negatív kontrollok esetében. A WG295 esetében erősebb, míg a WG305 és a kvarckezelésnél gyengébb jelet kaptunk.

Az ANAC13 gén UV-B indukciója gyors és tranzien

A hétnapos Ws csíranövényeket WG327 és WG305-ös alulvágó filterek felhasználásával kezeltük UV-B-vel. 0,5-, 1-, 2-, 4-, és 8 órával a kezelés

kezdetét követően mintát szedtünk teljes RNS kivonáshoz. A mintákat Northern analízissel vizsgáltuk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az ANAC13 gén UV-B válasza gyors és tranziens, a transzkriptum szintje megközelítőleg 1h-nál éri el maximumát, majd fokozatosan lecsökken.

Az ANAC13 transzkripcionális szintű UV-B válasza részben független a már ismert fotoreceptoroktól

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 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.

Az ANAC13 UV-B jelátvitelben elfoglalt pozíciója

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? Szemi-kvantitatív RT-PCR vizsgálatot végeztünk, melyben összehasonlítottuk az endogén ANAC13 expressziós mintázatát UV-B-vel kezelt vad típusú növényekben, és különböző mutáns hátterekben. Megállapítottuk, 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 típussal (Col) összehasonlítva.

Az ANAC 13 aktiválódik vörös fény kezelésre

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

hullámhosszú UV-B kezelés esetében eltolódott a hosszabb hullámhossz irányába, így szerepe az ANAC13 gén UV-B válaszában feltételezhető.

Már azonosították az UV-B által indukált fotomorfogenetikus jelátviteli folyamat néhány kulcsfontosságú szabályozó elemét, mint például a bZIP transzkripciósfaktor HY5, az E3 ubikvitin-ligáz COP1 és az UVR8 fehérjét. Kimutatták, hogy növényekben az UVR8 és COP1 fehérjék a sejtmagban közvetlenül UV-B specifikus kölcsönhatásba lépnek. A HY5-nak, és főleg a HY5-nek a COP1-től és az UVR8-től downstream irányban van fontos szerepe az UV-B indukálta jelátviteli folyamatokban. Az UV-B indukálta fotomorfogenezisre specifikus körülmények között, a válaszában résztvevő gének döntő többségének expressziója a COP1-től és az UVR8-től függ. 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 riporter 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.

Az UV-B sugárzás által indukált jelátviteli út eddig azonosított tagjainak legtöbbször, számos más fény jelátviteli út szereplőjeként is ismert. A HY5 a fotomorfogenezis első és legintenzívebben vizsgált pozitív szabályozója, feltehetően downstream irányban működik több fény által kiváltott és más fejlődésben szerepet játszó jelátviteli folyamatban. 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. A fenilpropanoid út egyik kulcsenzime a KALKON-SZINTÁZ expresszióját az UV-B mellett a vörös/távoli vörös és a kék/UV-A fény is szabályozza. 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

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 kvarckezelésre is indukálódott. Ez azért érdekes, mert a WG305, WG295 és kvarckezelés azonos spektrumot fed le azzal a különbséggel, hogy a WG295 és kvarc kiterjed a rövidebb hullámhossz irányába. 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 microarray analízis eredményeire támaszkodva érdeklődésünket a legnagyobb indukciót mutató gének irányába fordítottuk. A kiméra gének luciferáz aktivitásának változásai hosszabb hullámhosszú, illetve szűretlen UV-B kezelést követően megerősítették és egyben kiterjesztették a microarray analízisben kapott adatokat. Emellett jelzik, hogy mind a tíz kiválasztott gén UV-B válasza főként a transzkripció szintjén szabályozott. Az ANAC13 UV-B kezelése során, a csökkenő transzmissziós tulajdonságú alulvágó filterek felhasználásával előállított négy különböző spektrum közül a WG295 esetében kaptuk a legerősebb transzkriptum felhalmozódást. Ez ugyancsak megerősíti a microarray analízis eredményét, azaz az ANAC13 transzkripciós aktivitása tovább indukálódik, ha az UV-B kezelést kiterjesztjük a rövidebb hullámhosszú tartományok felé.

A legtöbb fejlődési folyamat során általában egynél több fotoreceptor vesz részt a fény érzékelésében, ami a különböző fény indukált utak közötti kölcsönhatások komplex hálózatát eredményezi. 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. Számos eredmény arra utal, 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. Ezekből a megfigyelésekből kiindulva vizsgáltuk meg az ANAC13 viselkedését, és kimutattuk, hogy transzkripcionális szintű 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 (*cry1cry2*) kettős mutáns esetében az eddig megfigyelt expresszió aránya a hosszabb és rövidebb

A CHS és még néhány, a fenilpropanoid bioszintézis útban résztvevő gén (CFI, F3H, FLS) promóterének szekvenciáját összevetettük az ANAC13 promóterének szekvenciájával. Az általunk vizsgált promóter két MRE^{CHS} és három ACE^{CHS} típusú elemet tartalmaz, közülük négy párban helyezkedik el. A promóter -1457 és -198 közötti szakaszának eltávolítása nem okozott jelentős változást sem a hosszabb hullámhosszú, sem a szűretlen UV-B indukcióban, azonban a vörös fény általi indukálhatóság megszűnt. A -1457 és -146 közötti szakasz eltávolítása sem hozott számottevő változást az UV-B válaszbán. Ezzel szemben, a közeli promóter régió feltételezett ACE^{ANAC13} és MRE^{ANAC13} elemeinek eltávolítása már drasztikus hatással volt az UV-B indukcióra is. Ennek a rövid (-110-tól +24-ig) konstrukciónak az expresszióját, hasonlóan a CaMV35S minimál promóterhez, az UV-B nem befolyásolja. Abban az esetben, amikor a rövid -110-tól +24-ig terjedő promóter szakaszt a CaMV35S minimál promóterrel helyettesítettük, 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). A feltételezett MRE^{ANAC13} elem szekvenciájának célzott mutációja teljesen megszünteti a konstrukció UV-B válaszát, míg a vörös fény indukció a harmadára csökken. Amikor a feltételezett ACE^{ANAC13} és MRE^{ANAC13} elemeket egyszerre rontottuk el a vörös fény válasz is teljesen megszűnt.

Pontmutánsok azonosítása luciferáz alapú genetikai szűrés során

Az UV-B-függő jelátviteli kaszkád elemeinek azonosítására elindítottunk egy luciferáz alapú genetikai szűrővizsgálatot *Arabidopsisban*. Két, egymástól független mutáns esetében, a Pro^{ANAC13}::Luc transzgén expressziója változatlan maradt, szemben a vad típusnál tapasztalt indukcióval. A szekvencia adatok azt mutatták, hogy mindkét mutáns egy pontmutációt hordoz, méghozzá a promóter közeli régiójának ugyanazon pozíciójában (-110). Irányított pontmutációs módszerrel generáltunk egy másik pontmutációt is a -107-es pozícióban. Ez a két pontmutáció egymástól függetlenül, külön-külön is a promóter UV-B indukálhatóságának csökkenését vonja maga után. A pontmutációkat hordozó kiméra géneket, illetve a vad típusú konstrukciót tartalmazó 5 napos, etiolált csíranövények vörös fény indukációjának mértékében nem tapasztaltunk lényeges változást.

Az azonosított UVBox^{ANAC13} szabályozó elem UV-B specifikus indukálhatóságot kölcsönöz a CaMV35S minimál promotórnak

A közeli promoterrégió 12bp hosszúságú fragmentjét, amely tartalmazza az UVBox^{ANAC13} szabályozó elem feltételezett core szekvenciáját, dimer formában alkalmaztuk. A CaMV35S promotórnak felhasználásával két konstrukciót hoztunk létre, az egyikben a vad típusú UVBox^{ANAC13} szerepel dimer formában a CaMV35S minimál promotér előtt, míg a másikban a mutáns UVBox^{ANAC13} dimer előzi meg a 35Smin promotert. Mindkettőt luciferáz riporterhez kapcsoltuk (Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc, mutPro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc). A Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc a Pro_{ANAC13}::Luc transzgénhez hasonlóan egyaránt indukálódik a hosszabb hullámhosszú és a szűretlen UV-B kezelés hatására is. 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 pontmutációt tartalmazó kiméra gén (mutPro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc) nem mutatott UV-B választ. A Pro_{ANAC13}::Luc konstrukció az UV-B sugárzás mellett jól indukálódik só-, hő-, és bár kisebb mértékben, de ABA és vörös fény kezelés hatására is. A Pro_{2xUVBoxANAC13-35Smin}::Luc, szemben a Pro_{ANAC13}::Luc transzgénnel, specifikusan csak az UV-B sugárzásra indukálódik, más, a kísérletünkben elvégzett kezelések nem voltak rá hatással.

Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy az ANAC13 gén UV-B válasza főként a transzkripció szintjén szabályozott. Az ANAC13 UV-B kezelése során, az előállított négy különböző spektrum közül a WG295 esetében kaptuk a legerősebb 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 szintű 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 szerepe az ANAC13 gén UV-B válaszában feltételezhető.

3. Kimutattuk, hogy az ANAC13 gén részben független a COP1, UVR8 és HY5 génektől, így valószínűsíthető, hogy az UVR8 függő jelátviteli út elemeinek (UVR8, COP1, HY5), illetve az ANAC13 gén expressziójának ellenőrzése 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 promotérében 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 promotér 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.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az UV-B sugárzás által indukált gyors és átmeneti transzkripciós változások, illetve a transzkripciós 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