

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

Tézisfüzet

Papdi Csaba

Témavezető: Dr. Szabados László

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

Szeged 2010

BEVEZETÉS

A növények helyhez kötött életmódjuk miatt ki vannak téve a környezetük viszonyosságainak. A környezeti stressz szempontjából a talaj magas sókoncentrációja, a szárazság és az alacsony hőmérséklet azok a tényezők, amelyek leginkább hatással vannak a növények növekedésére és fejlődésére. A növények egy összetett védekező mechanizmussal rendelkeznek, hogy elkerüljék a környezeti stressz okozta károsodásokat. A stressz érzékelését követően összehangolt jelátviteli hálózatok aktiválódnak, ezek génkifejeződés változásokat idéznek elő, amelyek biokémiai és fiziológiai válaszok formájában fejeződnek ki. A stressz érzékelés és a jelátvitel összetettsége bonyolulttá teszi ezen mechanizmusok és kapcsolataik megértését. Jelenlegi ismereteink ezen a téren, főként a *Arabidopsis thaliana* modell növény molekuláris genetikai vizsgálataiból származnak.

Az abiotikus stressz elsődleges érzékeléséért felelős receptor molekulák közül ezidáig egyedül az AtHK1 hibrid hisztidin-kináz feltételezett ozmoszenzort azonosították, amely vízvesztés következtében és sóstresszre is aktiválódik (Urao et al. 1999, *Plant Cell* **11**: 1743). A stressz érzékelését követően különböző jelátviteli hálózatok aktiválódnak, ezek működése még nem ismert részleteiben. Több másodlagos jelátviteli komponenst azonosítottak, ezek közé tartoznak a reaktív oxigén formák (ROS), az inozitol foszfátok és a citoplazmatikus Ca^{2+} . A másodlagos jelátvivők általában CDPK, SnRK és MAPK típusú fehérje kinázok általi foszforilációs folyamatok működését szabályozzák, melyek legtöbbször transzkripciós faktorokat aktiválnak.

Az abszcizinsav (ABS) növényi hormon központi szerepet játszik az abiotikus stressz válaszok szabályozásában. Részt vesz a sztómák záródásának szabályozásában, a magnyugalom előidézésében, elősegíti a raktározó fehérjék

felhalmozódását és az embrió kiszáradás elleni védetségét, gátolja az embrionális fázisból a csírázásba való átmenetet és egyéb élettani folyamatokra is hatással van. Az ABS összetett jelátviteli mechanizmusokon keresztül serkenti számos abiotikus stressz indukálta gén kifejeződését.

Növényi stressz válaszok szabályozásáért felelős gének azonosítására több genetikai stratégia is alkalmazható. Több példa van arra, hogy *Arabidopsis* stressz gének funkcionális azonosításához és jellemzéséhez funkció-vesztést okozó inszerciók, deléciónok vagy pont mutációk vizsgálatát alkalmazták. Az ilyen típusú mutációk akkor szolgáltatnak információt egy gén funkciójáról, ha az adott gén termékének hiánya bizonyos fenotípusokat idéz elő. Azonban nem azonosíthatóak azok a gének, melyekből több példány található a genomban, ugyanis a megkettőződött gének legtöbbször hasonló kifejeződési mintázatot mutatnak és a termékeik is hasonló funkciókat látnak el. Ezek a módszerek szintén nem alkalmasak, olyan gének azonosítására, melyek gécscsaládokba tartoznak és a gécscsalád több tagjának funkciója legalább részben átfed egymással. A létfontosságú gének esetében más jellegű problémával kell számolni, ugyanis a mutációjuk gyakran okoz embrió letalitást, így funkciójuk vizsgálatai nehezen kivitelezhetővé vagy éppen lehetetlenné válnak (Errampali et al. 1991, *Plant Cell*, **3**:149).

Pont mutációk okozhatnak funkció-nyerést is abban az esetben, ha a mutáció a fehérje funkciójának megváltozását idézi elő vagy megnöveli a cél gén kifejeződését. Típusosan funkció-nyeréses domináns mutációt okozhat az aktiváció-jelölés módszere, ezért alkalmas gén családok funkciójának azonosítására (Nakazawa et al. 2003, *Plant J*, **34**: 741). Az aktiváció-jelölés során olyan speciális T-DNS vektorokat alkalmaznak, melyek erős, konstitutív transzkripcionális enhanszereket tartalmaznak és egy gén közelébe történő beépülésük során, a cél gén kifejeződésének szintjét fokozhatják. Fontos megjegyezni azt, hogy a kívülről bejuttatott promóter vagy enhanszer elemek akkor tudnak egy gént aktiválni, ha a T-DNS a gén elé és nem a kódoló régióba

épül be, ráadásul olyan orientációban, hogy képes befolyásolni annak aktivitását. Viszont a genomba épülő enhanszer elemek számos közelben található gén transzkripciójára hatással lehetnek, így elképzelhető, hogy a mutáns fenotípusa több gén megváltozott működésének az eredménye. Funkcionyeréses allélok előállítására kítűnően alkalmazható a növények random cDNS könyvtárral történő genetikai transzformációja is. A véletlenszerűen beépült cDNS szálak túltermelése domináns fenotípust eredményezhet, amely megfelelő genetikai szűréssel azonosítható. A beépült cDNS konstitutív túltermelése megnehezítheti az érintett gén vizsgálatát, ugyanis előfordulhat, hogy a magas transzkripcionális aktivitás csökkent életképességet, pollen sterilitást vagy embrió letalitást okoz. Bizonyos stressz válasz gének konstitutív kifejeződése csökkentheti a sejtosztódást és törpe, steril növényeket eredményezhet (Kasuga et al. 1999, *Nat Biotechnol*, **17**: 287; Gilmour et al. 2000, *Plant Physiol*, **124**:1854).

Egy új genetikai rendszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas stressz válaszokat szabályzó ismeretlen gének azonosítására. Megalkottunk egy szabályozott működésű cDNS túltermelő rendszert; *Gateway* módszerrel *Arabidopsis* cDNS könyvtárat klónoztunk a kémiai indukálható pER8-GW transzformációs vektorba (Zuo et al. 2000. *Plant J*, **24**: 265). A cDNS könyvtárat olyan *Arabidopsis* növényekbe juttattuk be, melyek tartalmazták az *ADHI-LUC* riportergént, így genetikai szűréssel az *alkohol dehidrogenáz 1* (*ADHI*) stressz válasz gén transzkripcionális szabályozásáért felelős géneket azonosítottunk.

CÉLKITŰZÉSEK

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

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

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *Arabidopsis thaliana* *in vitro* és *in vivo* termesztése;
- Arabidopsis Agrobaktérium közvetített genetikai transzformációja, transzgenikus növények szelekciója;
- DNS enzimatis módosításán alapuló molekuláris klónozási technikák;
- Növény genomi DNS és össz-RNS tisztítása;
- Gén kifejeződés vizsgálatok: szemikvantitatív és valós idejű RT-PCR;

- *In vivo* luciferáz enzim aktivitás mérés ép csíranövényekben;
- Hisztokémiai festésen alapuló vizsgálatok (GUS riporter gén aktivitás, alkohol dehidrogenáz enzim aktivitás).

EREDMÉNYEK

1. Létrehoztunk egy *Arabidopsis* cDNS könyvtárat, és az ösztradiol indukálható pER8-GW plazmidba klónoztuk. A pER8-GW/cDNS könyvtárat *Agrobacterium* sejtekbe transzformáltuk, így alkalmassá vált, növények genetikai transzformációjára. Véletlenszerűen kiválasztott cDNS-ek megszekvenálása szerint a cDNS populáció több mint a fele teljes hosszúságú. A későbbiekben további cDNS-ek megszekvenálásával hasonló arányokat kaptunk.
2. A specifikus stressz jelátvitel közvetítésének tanulmányozása céljából, előállítottuk az *ADHI-LUC* riporter gént, amiben a stressz és ABS indukálható *Arabidopsis alkohol dehidrogenáz 1 (ADHI)* gén promóterét a szentjánosbogár luciferáz génnel kapcsoltuk össze. Transzgenikus *Arabidopsis* növényeket állítottunk elő, melyek tartalmazták az *ADHI-LUC* gént, és utódaikból olyan vonalakat kerestünk, melyek ABS kezelés hatására riporter gén aktivitást mutattak. Kiválasztottuk a 16-os vonalat, ami ABS kezelés nélkül viszonylag alacsony luciferáz aktivitást mutatott, viszont ABS kezelés hatására a mérhető biolumineszcencia szintje nagymértékben felerősödött. Ebből a vonalból homozigóta vonalat (ADH-LUC) állítottunk elő. Az ADH-LUC vonal további tesztelése során, az ABS kezelés mellett a NaCl, mannitol, szacharóz és hidrogén-peroxid kezelésekkkel is elő tudtuk idézni a luciferáz aktivitás nagymértékű növekedését. Az ABS kezelés és stressz hatására

bekövetkező bioluminszcencia változások hasonló jellegűek voltak, azonban az ABS gyorsabban váltotta ki a riportergén aktivitásának növekedését.

3. Az *ADHI* gén transzkripció szabályozásában résztvevő gének azonosítása érdekében az *ADHI-LUC* riporter gént hordozó ADH-LUC vonalat transzformáltuk az indukálható expressziójú cDNS könyvtárral. A utódgenerációban olyan növényeket kerestünk, melyben az *ADHI-LUC* riporter gén aktivitását, ABS vagy stressz hatás nélkül is indukálta az ösztradiol kezelés. Több transzformált vonalat találtunk megnövekedett luciferáz aktivitással. Két vonalat azonosítottunk, melyekben a riporter gén működés változása egyértelműen a cDNS ösztradiol általi indukációjától függött.
4. Az ADH/121 vonal biolumineszcenciája ABS kezelés után hasonló módon növekedett mint a cDNS inszerciót nem tartalmazó ADH-LUC vonalban. Az ösztradiol hatására azonban a luciferáz aktivitás fokozódás lassabb és eltérő jellegű volt. Az ABS és ösztradiol kombinált kezelése a riporter gén működésének nagymértékű növekedését idézték elő, amely sokáig fennmaradt, ún. szinergisztikus hatásuk volt. Valós idejű RT-PCR-rel bebizonyítottuk, hogy az ADH/121 növények ABS és ösztradiol kezelése az *ADHI* mRNS mennyiségét is megnöveli. Hisztokémiai festéssel kimutattuk, hogy az indukált cDNS fokozta az ADH1 enzim működését.
5. Azonosítottuk az ADH/121 vonal cDNS inszertjét. A cDNS a RAP2.12 (related to apetala 2) fehérjét kódolja, ami egy AP2/ERF típusú transzkripció faktor. A RAP2.12 hatásának további teszteléséhez a megklónozott cDNS-t ismét pER8-GW expressziós vektorba építettük és

növényekbe transzformáltuk. Az utódok vizsgálata során, az ösztadiol kezelés következtében hasonló riporter-gén aktivációt tapasztaltunk, mint amelyet az ADH/121 vonal esetében láttunk.

6. Szemikvantitatív RT-PCR reakcióval bemutattuk, hogy az ADH/121 vonalban a RAP.12 mRNS szintje ösztadiol függően emelkedik, de az ABS kezelés nem indukálja.
7. Az *ADH1* promóter és a RAP2.12 faktor kölcsönhatásának tanulmányozása érdekében az ADH/121 növényeket olyan *ADH1-GUS* riporter-gén konstrukciókat tartalmazó növényekkel kereszteztük, melyekben a GUS riporter-gén elé épített ADH1 promóter ismert transzkripciós faktor kötőhelyeit elrontották vagy deléciókkal eltávolították. Az ösztadiol indukció GT, GC és G-BOX elemek hiányában is képes volt az *ADH1* promóter vezérelt GUS enzimaktivitás kiváltására.
8. A RAP2.12 fehérjével nagy szekvencia homológiát mutató RAP2.2 és RAP2.3 fehérjét kódoló cDNS-eket pER8-GW expressziós vektorba klónoztuk és ADH-LUC növényekbe transzformáltuk. A RAP2.2 és RAP2.3 faktorok is képesek voltak a riporter-gén aktivitás fokozására ösztadiol indukciót követően, ami arra utal, hogy a géncsalád többi tagjának biológiai funkciója hasonló, illetve átfedő lehet.
9. A Genevestigator *microarray* adatbázisban közzétett adatok alapján, összehasonlítottuk az *Arabidopsis* különböző szerveiben, szöveteiben és fejlődési állapotában, illetve különböző hormon és stressz kezelések után detektált *RAP2.2*, *RAP2.3* és *RAP2.12* gének kifejeződésének mintázatát. A *RAP2.3* nagyon alacsonyan fejeződik ki a növény fejlődésének

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

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

PUBLIKÁCIÓS LISTA

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

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