

Szövettípusokra jellemző folyamatok az UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) UV-B fotoreceptor jelátviteli rendszerében

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Bernula Péter

Témavezetők:

Prof. Dr. Nagy Ferenc – kutatóprofesszor

Dr. Viczián András – tudományos főmunkatárs



Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

Szeged

2018

Bevezető

A növények ki vannak téve a környezetben tapasztalható folyamatos változásoknak, ezért ezekhez alkalmazkodniuk kell. Az egyik legfontosabb környezeti tényező a fény, mivel a növények energiaforrásként hasznosítják, azonban a napfény, éppen magas energiatartalma miatt, akár komoly károkat is okozhat. Annak érdekében, hogy a növények a fényviszonyokhoz alkalmazkodni tudjanak, különböző hullámhosszúságú fényben működő fotoreceptorokat használnak a fény mennyiségi, minőségi, időbeli, illetve irányában bekövetkező változásainak követésére.

A természetes napfény része az UV-B sugárzás, aminek érzékelése kiemelten fontos, ugyanis a napfényben az UV-B sugarak rendelkeznek a legnagyobb energiatartalommal, ami miatt könnyen károsíthatják a növények makromolekuláit. A növények a védekezésük érdekében jelként is képesek az UV-B sugarakat érzékelni. A jelként szolgáló gyenge UV-B sugárzás érzékelésében az UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) fotoreceptornak van a legfontosabb szerepe. Az UV-B által aktivált UVR8 a COP1 E3 ubiquitin ligáz inaktiválása révén a HY5 (fotomorfogenezisben kulcsszerepet játszó) transzkripciós faktort felszabadítja a COP1 általi gátlás alól, ennek következtében fotomorfogénikus válaszok indulnak el a növényben. Az UVR8 aktiválódás hatására számos egyéb folyamat is elindul, ilyen például az UV-B szűrő flavonoidok felhalmozódása. Az UVR8 szerteágazó hatása annak köszönhető, hogy jelátviteli rendszere szorosan összefonódik más fotoreceptorokéval és sokféle hormonális jelátvitel működésével is kapcsolatban áll.

A fényhez kötött jelátviteli rendszerekben sok példát találhatunk szerv-, illetve szövetspecifikus részfolyamatokra, amelyek összehangolt működésük révén, akár szöveti autonómiát nem mutató egyéb részfolyamatokkal együtt, kialakítják a szükséges összetett válaszreakciót. Éppen ezért, ha átfogó képet szeretnénk kapni egy adott válaszreakció lefolyásáról, érdemes a részfolyamatok jellegzetességeire koncentrálni.

Célkitűzések

Mivel az UVR8-cal kapcsolatban eddig nem vizsgálták a jelátviteli folyamatok szövetspecifitását, célul tűztük ki, hogy YFP-UVR8 fehérjét bizonyos szövetekben termelő transzgenikus *Arabidopsis* növények segítségével megvizsgáljuk a legismertebb UVR8-függő válaszok szövettípusoktól függő, vagy független lefolyását.

A kis intenzitású UV-B sugárzás számos növekedési és fejlődési folyamatot szabályoz anélkül, hogy komolyabb károsodást okozna, viszont kiváltja a növények akklimáció érdekében bekövetkező védekező válaszait. Az UVR8 UV-B fotoreceptor azonosítása óta kifejezetten erősen kutatott területté vált az UV-B által irányított jelátviteli utak felderítése. Több fotoreceptorral kapcsolatban számos adat áll rendelkezésre különböző szövetekben lejátszódó jelátviteli folyamatokról. Az UVR8 fotoreceptorral kapcsolatban eddig nem álltak rendelkezésre

szövetspecifikus működésre vonatkozó adatok, ráadásul az UVR8 jelátviteli folyamataira vonatkozó információk is hiányosak. Ezek vizsgálatára az UVR8 saját promóterével és egyéb, széles körben használt szövetspecifikus promóterek segítségével kifejeztük az YFP-UVR8 kimérafehérjét transzgenikus *uvr8* mutáns növényekben. Ezekkel a növényekkel, illetve más, az UVR8 irányította jelátviteli utakban szerepet játszó komponenseket kifejező transzgenikus növények vizsgálatával célul tűztük ki, hogy:

1. felderítsük az UVR8 mennyiségének eloszlását a különböző szövetekben;
2. megvizsgáljuk az UVR8 szövetspecifikus hatásait fotomorfogenikus, akklimációs és fototropikus válaszokra;
3. felderítsük az UVR8 funkcióira vonatkozó, csíranövényekben és felnőtt növényekben mutató esetleges különbségeket;
4. riporter konstrukciók segítségével megvizsgáljuk néhány, az UVR8 irányította jelátvitelben szereplő gén kifejeződésének mintázatát;
5. megfigyeljük a felnőtt növények UV-B indukálta fototropikus válaszát és a mögötte álló molekuláris szintű változásokat.

Anyagok és módszerek

Növénynevelés és fénykezelés

Kísérleteinkhez (és transzgenikus vonalaink előállításához) *Arabidopsis thaliana* L (Heynh.) *uvr8-6*, *uvr8-7*, *hy5-ks50*, *phot1phot2amiUVR8* mutáns, Wassilewskija (Ws) és Columbia (Col) növényeket használtunk, utóbbi kettőt vad típusú kontrollként.

A magok 72 órás duzzasztáson estek át, sötétben, 4 °C-on (csírázás indukció). A mikroszkópos kísérletekhez a csíranövényeket 12 óra fehér fény ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/12 óra sötét ciklusban neveltük 22 °C-on 6 napig, ezután UV-B fényvel ($1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kiegészített folyamatos fehér fény ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) alá tettük őket. A hipokotilhossz- és sziklevél felületmérésekhez a csíranövényeket 3 napig növénynevelő kamrában tartottuk, mielőtt megkapták az UV-B fényvel kiegészített folyamatos fehér fényes kezelést 4-, vagy 5 napon keresztül. A morfogénikus, túlélési, valamint a klorofilltartalom-meghatározás kísérletekhez a növényeket 8 óra fehér fény/fehér fény+kiegészítő UV-B sugárzás (fehér fény: $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, UV-B: $2/12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/16 óra sötét periódusban neveltük 22 °C-on 7 hétig. Flavonoid eloszlás meghatározás kísérleteinkhez 16 óra fehér fény ($65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/8 óra sötét ciklusban neveltük a növényeket 5-6 hétig 22 °C-on. Mikroszkópia előtt a növényeket $1,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UV-B-vel kiegészített $2,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású fehér fényvel kezeltük (12 óra), míg a szárelhajlás kísérlethez $1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású, egyirányú UV-B sugárzást alkalmaztunk egész éjszakán keresztül.

Felhasznált kísérleti módszerek

- Molekuláris klónozás (új riporter-konstrukciók előállításához);
- növényi fehérjekivonat készítés és fehérje szint meghatározás Western blot módszerrel;
- transzkript szint meghatározása qRT-PCR módszerrel;
- hipokotilhossz és sziklevél felület vizsgálatok;
- egyoldali UV-B felé történő szárelhajlás vizsgálata automatizált, web-kamera alapú képrögzítő rendszerrel;
- klorofillszint meghatározás;
- metszetkészítés növényi szövetekből vibratómmal mikroszkópos vizsgálatokhoz;
- flavonoid felhalmozódás vizsgálatok csíranövényben/virágzati szárban konfokális lézerszkennelő mikroszkóp (CLSM) segítségével;
- YFP/GFP jel analízise CLSM segítségével.

Eredmények összefoglalása

Az UVR8 kifejeződési mintázatának vizsgálata

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az UVR8 fehérje kifejeződésének mintázatát a különböző szövetekben, előállítottunk egy olyan transzgenikus vonalat, amely az YFP-UVR8 fúziós fehérjét az endogén UVR8 promóter (*ProUVR8*) irányítása alatt termeli *uvr8* mutáns háttérben (ProUVR8 vonal). A kifejeződés mintázatát CLSM segítségével vizsgáltuk. Az YFP-UVR8 termelődését megfigyeltük csíranövények hipokotiljának, valamint sziklevelének epidermiszben és mezofill/szubepidermális szöveiben, valamint felnőtt növények epidermiszében és kortexében. A szállítószövetekben nem tudtuk detektálni az YFP-UVR8 jelenlétét, de ennek oka lehet, hogy a ProUVR8 vonalunk a vad típusban mérhető UVR8 mennyiséghez képest csak hozzávetőlegesen tizedannyi YFP-UVR8-at termel, emiatt nem zárhatjuk ki a lehetőségét, hogy vad típusú növények szállítószöveitei tartalmazhatnak UVR8-at. Mindezek ellenére valószínű, hogy ha van is UVR8 a szállítószövetekben, fotoreceptor szerepe ott elenyésző, hiszen az UV-B sugárzás alig jut el a mélyebb növényi szövetekhez.

Az YFP-UVR8 fehérjét különböző szövetekben kifejező transzgenikus növényi vonalak jellemzése

Meg szeretettük volna vizsgálni az UVR8 szerepét különböző szövetekben, ezért előállítottunk olyan növényi vonalakat, amelyek az YFP-UVR8-at a *ProML1*, *ProCAB3*, vagy *ProSUC2* promóter irányítása alatt fejezik ki (*ML1*=*MERISTEM LAYER 1*, *CAB3*=*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 3*, *SUC2*=*SUCROSE-PROTON SYMPORTER 2*). Ezeket a promótereket széleskörben alkalmazzák fehérje-termeltetésre az epidermiszben (*ProML1*), mezofill/kortex szövetekben (*ProCAB3*), és a szállítószöveti kísérősejtben (*ProSUC2*). A létrehozott vonalak elnevezése: ProML1, ProCAB3 and ProSUC. Vizsgálataink alapján a ProML1 csíranövények valóban az epidermiszben (a szikleveleiben és hipokotilban és a szárban egyaránt), a ProCAB3 csíranövények mezofilljükből, valamint szubepidermális/kortex sejtjeikben tartalmaznak kimutatható mennyiségű YFP-UVR8-at. A várakozásoknak megfelelően nem észleltük ezeknek a promótereknek az aktivitását a szállítószövetekben. A *ProSUC2* viszont nem csak a hipokotil és a sziklevelek szállítószövegeiben, hanem a szubepidermális/kortex sejtben is mutatott aktivitást.

Western blot analízissel megállapítottuk, hogy a vad típusú csíranövényben mérhető endogén UVR8 szinthez képest a ProML1 vonalban az összes YFP-UVR8 fehérje szintje hozzávetőlegesen 5%, a ProSUC2-ben 25%, míg a ProCAB3 vonalban 75%. Ezzel a módszerrel csak a csíranövényekben előforduló összes YFP-UVR8 mennyisége határozható meg, külön-külön az egyes szövetekben termelődött mennyiségek nem, ezért a fehérjeszinteket CLSM-mel is megmértük. Ezzel a megközelítéssel vizsgálva a különböző szövetekben található YFP-UVR8 mennyiségek egymással összehasonlíthatóak a mikroszkópos képeken látható YFP jelek lemérése alapján. Az YFP-UVR8 fehérje mennyisége az epidermiszben hasonlóan mutatkozott a ProUVR8 és a ProML1 vonalakban, a ProUVR8 mezofilljéhez képest 4-5-ször több fehérje van a ProCAB3 vonal mezofill sejtjeiben, míg ugyanott a ProSUC2 vonal a ProUVR8-ban mérhető szintet mutat. Ezzel a módszerrel a mélyebben elhelyezkedő szállítószövetekben a jelek intenzitását nem tudtuk vizsgálni.

Az YFP-UVR8-at különböző szövetekben termelő csíranövények UV-B-függő válaszainak vizsgálata

Munkánk során célunk volt felderíteni, milyen funkciókat lát el az UVR8 fehérje a különböző szövetekben: vannak-e specifikus, szövettípusokra jellemző UVR8-függő válaszok, jelátviteli folyamatok. A fölmerült kérdések megválaszolása érdekében transzgenikus csíranövényeinkben megvizsgáltuk az UV-B hatására adott legfontosabb fotomorfogénikus válaszokat: a hipokotil nyúlás gátlását, valamint a sziklevelek növekedését. Az általunk használt gyenge UV-B-kezelés hatására a

hipokotil megnyúlás gátlása erősödött a vad típusú csíranövények esetében, míg az *uvr8* mutánsok elhanyagolható mértékű választ adtak. Mindegyik transzgenikus vonalunk (kivéve a ProSUC2-t) jól mérhető hipokotil megnyúlás gátlás választ mutatott, de egyik sem volt képes teljes mértékben helyreállítani az *uvr8* mutáns fenotípust.

Megvizsgáltuk azt is, hogyan változik a sziklevelek felületének mérete UV-B besugárzás hatására: az *uvr8* mutáns, a ProCAB3 és a ProSUC2 csíranövények szikleveleinek csökkent a felülete, ezzel szemben a ProUVR8, ProML1 esetében a vad típusú növényekhez hasonló, kismértékű sziklevel felületnövekedést tapasztaltunk.

Az eredményeket összesítve kijelenthetjük, hogy az YFP-UVR8 fúziós fehérje funkcióképes UV-B fotoreceptorként működik a transzgenikus vonalainkban. Ezen kívül megállapíthatjuk, hogy az epidermiszben és a mezofill/szubepidermális sejtekben található UVR8 fotoreceptor egyaránt hozzájárul az UV-B indukált hipokotil megnyúlás gátlásához. Az eredmények arra is rávilágítanak, hogy UV-B fényben a megfelelő sziklevel felületnövekedéshez nélkülözhetetlen az epidermiszben kifejezett UVR8, mivel ezt a funkciót csak az epidermális UVR8 képes ellátni, így ez a szabályozási mód szöveti autonómiát mutat. Kiderült továbbá, hogy a szállítószövetekben található UVR8-nak valószínűleg nincs számottevő szerepe a vizsgált fotomorfofenikus válaszok szabályozásában.

UV-B-fototropizmus felnőtt növények esetében

A csíranövények UV-B sugárzás irányába történő hipokotil elhajlását már körülbelül 30 éve megfigyelték, de az a felfedezés, hogy ez a fototropinok és az UVR8 működése révén valósul meg, a közelmúltig váratott magára. Eddig nem állt rendelkezésre adat arra vonatkozóan, hogy vajon a felnőtt növények virágzati tengelye (szára) is elhajlik-e a csíranövények hipokotiljához hasonlóan az egy irányból érkező UV-B sugárzás felé. Ennek vizsgálatára olyan növényeket világítottunk meg egyoldalról UV-B-vel, melyek virágzati tengelye legalább 5 cm magas volt (5-10 cm) és követtük a bekövetkező elhajlást egy web-kamera alapú automatikus rendszerrel.

Érdekes módon, míg az *uvr8* csíranövények vad típusra jellemző elhajlást mutatnak UV-B irányába, addig a felnőtt *uvr8* növények csak elhanyagolható mértékű elhajlás választ adtak. Ezek alapján kiderült, hogy a csíranövény fázissal ellentétben a fototropinok nem játszanak fontos szerepet felnőtt növényekben a fototropikus elhajlás szabályozásában, így az általunk használt növények alkalmasak az UVR8-függő szárelhajlás vizsgálatokra. A vad típuséhoz hasonló elhajlást mutatott az YFP-UVR8-at a saját promóterével kifejező ProUVR8, valamint az YFP-UVR8-at a kortexben termelő ProCAB3 vonal is. Az YFP-UVR8 fehérjét a szállítószövetben és kis mennyiségben a kortexben is termelő ProSUC2, valamint az epidermiszben alacsony szinten termelő ProML1 vonal csak részlegesen reagált az UV-B kezelésre. Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy felnőtt növényben az egyoldali UV-B sugárzás irányába megfigyelhető elhajlást leginkább

a mezofillben/kortexben található UVR8 szabályozza, de az epidermális UVR8 is hatékonyan részt vesz a folyamatban, hiszen nagyon kevés epidermális YFP-UVR8 is elég volt egy jól mérhető válasz kialakításához. A szállítószövetekben lévő UVR8 fotoreceptor nem járul hozzá jelentősen a szárelhajlás kiváltásához, mivel a ProSUC2 vonal esetében tapasztalt válasz valószínűleg a kortexben található UVR8-nak volt köszönhető. Az eredmények továbbá arra utalnak, hogy bizonyos mértékig az UVR8 mennyisége is befolyásolja a szár elhajlását.

Flavonoid felhalmozódás

A növények UV-B sugárzás hatására aktiválódó védekező reakciói közé tartozik az UV-B szűrő flavonoidok felhalmozódása. Célunk volt vizsgálni, hogy ez a folyamat szövetautonóm-e, vagy sem. A DPBA nevű vegyület fluoreszkáló komplexet képez a flavonoid molekulákkal, amit CLSM segítségével több különböző növényi rendszerben vizsgáltak korábban. Csíranövényeken végzett kísérleteink során olyan mértékű UV-B sugárzással kiegészített megvilágítást alkalmaztunk, ami az *uvr8* mutánsokban nem, a vad típusú csíranövényekben viszont kimutatható mértékű flavonoid felhalmozódást váltott ki. Az UV-B hatására a vad típusú és az YFP-UVR8-at termelő transzgenikus növényi vonalaink esetében is kimutatható volt a flavonoidok UVR8-függő felhalmozódása, bár a transzgenikus vonalainkban ennek mértéke alacsonyabb volt a vad típusban tapasztalathoz képest. Eredményeink alapján a ProML1 vonalban sokkal kevesebb epidermális UVR8 is elég volt ugyanolyan szintű flavonoid szint eléréséhez, mint amelyet az erős túltermelő ProCAB3 vonalunk esetében tapasztaltunk, ami arra utal, hogy az epidermiszben található UVR8 hatékonyabban működik ebben a folyamatban.

Felnőtt növényekben is vizsgáltuk a flavonoidok felhalmozódását. Az 5-10 cm-es szárral rendelkező felnőtt növényeket egy oldalról UV-B-vel ($1,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) világítottuk meg, DPBA festéssel tettük láthatóvá a szárban felhalmozódott flavonoidokat. Vibratóm készülékkel metszeteket készítettünk, amiket azután CLSM-mel vizsgáltunk. Az általunk megfigyelt flavonoid-felhalmozódás is UVR8-függőnek bizonyult. Azt tapasztaltuk, hogy az epidermiszben felhalmozott flavonoidoké a legfontosabb szerep, ami nem meglepő, hiszen az UV-B elleni védekezésben a növények epidermisze képezi az első védelmi vonalat. Ennek ellenére a mélyebb rétegekben termelődő flavonoidok is fontos szerepet játszanak, főleg erősebb UV-B sugárzásban: ha erős az UV-B sugárzás, nagyobb eséllyel jut el a mélyebb szövetekbe is, ebben az esetben szükséges a kortexben, nagy mennyiségben felhalmozható flavonoidok UV-B szűrő szerepe. A kortexben UVR8-at termelő vonalakban valóban nagy mennyiségben halmozódott fel flavonoid a mélyebb szöveti rétegekben. Az erős UVR8 termelő ProCAB3 vonalhoz képest a gyengébben termelő ProUVR8 vonal kortexében kevesebb a flavonoid, ami arra utal, hogy az UVR8 nem csak jelenlétével (szöveti autonómiát mutatóan), hanem mennyiségével is befolyásolja ezt a védekező választ.

Érdekes jelenség, hogy az epidermiszben YFP-UVR8-at nem termelő transzgenikus vonalak (ProCAB3, ProSUC2) epidermiszében is sikerült flavonoidokat detektálni, amit vagy az UVR8 által elindított jelek terjedése, vagy a flavonoidok transzportja okozhat, továbbá az epidermisz UV-B elleni védekezésben betöltött kiemelt szerepére utal. Az YFP-UVR8-at epidermiszben termelő ProML1 vonal szárában viszont csak az epidermiszben találtunk nagy mennyiségű flavonoidot, ami alapján az UVR8 jel és/vagy a flavonoid transzport csak az epidermisz felé irányul, onnan visszafelé nem

A vad típusban és az összes transzgenikus vonalunkban jól látható különbség alakult ki a megvilágított oldal és az árnyékos oldal flavonoid felhalmozódása között: minden esetben a megvilágított szárfélben halmozódott fel több flavonoid. Ez arra utal, hogy (legalábbis ebben a folyamatban) az UVR8 ott fejt ki hatását, ahol az UV-B sugárzás miatt aktív állapotba kerül, vagyis az UVR8 jel nem terjed el a növény árnyékos részei felé. Ez a mintázat nagyon hasonlít a HY5 (és a HYH) fehérje felhalmozódására és a *CHS* (*CHALCONE SYNTHASE*) flavonoid bioszintézis-gén expresszióemelkedés-mintázatára is: az UVR8 hatására megemelkedik a HY5 szint, ami pedig fokozza a *CHS* gén működését. Ez lehet a kulcsa a szárban megfigyelhető egyenlőtlen flavonoid eloszlásnak.

Felnőtt növények akklimációjának és túlélésének vizsgálata

Az UVR8 fontos szerepet játszik a felnőtt növények UV-B-hez történő alkalmazkodásában is. A kísérletekben használt alacsony intenzitású kiegészítő UV-B sugárzás a vad típusú növények tölevélrózsáinak növekedését és a levélnyel megnyúlását gátolta. Ezzel ellentétben az *uvr8* mutáns növények tölevélrózsáinak növekedését alig befolyásolta, ezen kívül a mutánsok levelei világoszöldek voltak (kevesebb klorofill), tehát ezekben a növényekben az UV-B érzékelés valóban sérült. Az YFP-UVR8-at különböző szövetekben expresszáló transzgenikus vonalaink hasonlóan válaszoltak az UV-B sugárzásra, mint a vad típusú növények. Tölevélrózsáik mérete és struktúrája a vad típuséhoz hasonló volt, kivéve a kisebb méretű tölevélrózsával rendelkező ProCAB3 növényeket, ami az UVR8 erős túltermelésének köszönhető.

Az UVR8 szükséges a fotoszintézis hatékonyságának fenntartásához UV-B sugárzásban, ezért megmértük a növények klorofilltartalmát is, ami alapján erről a szabályozási útvonalról kaphatunk képet. Minden növényben hasonló klorofill-mennyiséget mértünk UV-B kezelés nélkül, UV-B hatására azonban az *uvr8* mutáns kivételével minden vizsgált növényben (legnagyobb mértékben a ProCAB3 növényekben) nőtt a klorofill mennyisége.

Az előzőekben leírt vizsgálatokban gyenge kiegészítő UV-B sugárzást alkalmaztunk, azonban ha nagyobb dózisban adunk kiegészítő UV-B sugárzást a fehér fényhez, vizsgálhatjuk a növények UV-B toleranciájának kialakulását is. Ezekhez a vizsgálatokhoz úgy választottuk meg a kiegészítő UV-B sugárzás dózisait, hogy ahhoz a vad típusú növények még képesek legyenek alkalmazkodni, míg az *uvr8* mutáns növényekre nézve már letális legyen. Ilyen körülmények között

a vad típusú növények mellett képesek voltak túlélni a ProUVR8 és a ProML1 növények is, bár tölevélrózsájuk kisebb volt, mint a vad típusé. A ProCAB3 és a ProSUC2 növények viszont erős UVR8 túltermelő fenotípust mutattak. Ez összefügg azzal, hogy ezek a növények, a csíranövényekhez hasonlóan, felnőtt korukban is magas szinten termelték az YFP-UVR8 fehérjét. Utóbbi eredmények alátámasztják a mezofillben/kortexben található UVR8 szerepét, valamint azt, hogy ezt a folyamatot is befolyásolja az UVR8 mennyisége.

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy hasonló körülmények között az epidermális és mezofillben/kortexben található UVR8 fotoreceptor egyaránt hatékonyan képes elősegíteni az UV-B tolerancia kialakulását, következésképpen a felnőtt növények túlélését. Valószínűsítjük, hogy erős UV-B sugárzás alatt a kortexben/mezofillben található UVR8-é a főszerep a védekező válaszok tekintetében: korábbi eredmények alapján valószínűleg az UVR8 szükséges az erős fényre érzékeny D1 és D2 fehérjeszint fenntartásához, ami nélkülözhetetlen a fotoszintézishez.

Az UVR8-függő *HY5* gén indukciója és *HY5* fehérje termelődése

A fény által indukált jelátviteli folyamatok kulcsfontosságú résztvevője az ELONGATED HYPOCOTYL 5 (*HY5*) transzkripciós faktor. A fotomorfogenikus válaszok elindulása jól követhető a *HY5* mRNS szintjének megemelkedésével, aminek következtében a *HY5* fehérje felszaporodik a sejtmagban. A *HY5* felhalmozódást az aktív UVR8 fotoreceptor is kiváltja. Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a *HY5* indukció és a *HY5* felhalmozódás szövetspecifitását, új transzgenikus vonalakat állítottunk elő. A ProUVR8, ProML1, ProCAB3 vonalainkba bejuttattuk a *ProHY5:HY5-GFP*, valamint a *ProHY5:GUS-GFP-NLS* konstrukciót, hogy CLSM segítségével vizsgálhassuk a *HY5* fehérje akkumulációját, illetve a *ProHY5* promóter működését csíranövényekben. UV-B megvilágítás hatására megemelkedett a *HY5-GFP* szintje azokban a sejtekben, amelyekben volt kimutatható mennyiségű YFP-UVR8 fotoreceptor, vagyis a folyamat szövetautonóm. A *ProHY5* aktivitása szintén szövetspecifikusan emelkedett meg az YFP-UVR8-at tartalmazó szövetekben.

Egyoldali UV-B kezelést követően megvizsgáltuk felnőtt növények szárában is a *HY5* (és a *HYH*) fehérje termelődésének UVR8-függését is, valamint a termelődés helyét. Mutáns háttérű (*hy5uvr8* és *hy5*), *ProHY5:HY5-YFP* transzgént hordozó növények szárából egész éjszakás UV-B kezelést követően metszeteket készítettünk, amelyeket CLSM segítségével vizsgáltunk. A *HY5-YFP* mennyisége nőtt az UV-B sugárzás hatására, ráadásul szinte kizárólag a szár megvilágított oldalán, ráadásul kimutattuk, hogy az UV-B sugárzás által kiváltott *HY5-YFP* felhalmozódása felnőtt növényben is UVR8-függő, mivel az UVR8 hiányos vonalban egyáltalán nem észleltük *HY5-YFP* jelenlétét.

Egyoldali UV-B sugárzás következménye, hogy a HY5 és a HYH fehérje felhalmozódásának szintje eltér a szár megvilágított és az árnyékos oldalán. Meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy a *HY5* és a *HYH* gén indukciója is ezt a mintát követi-e: vad típusú és *uvr8* mutáns növények szárait hosszanti vágással elfeleztük, és a két félben meghatároztuk a *HY5* és a *HYH* mRNS mennyiségét. Az UV-B-vel megvilágított oldalról származó szárfelékben a *HY5* és *HYH* mRNS magasabb szinten halmozódott fel, mint az árnyékos oldaliakban. Az mRNS szintek növekedése nem figyelhető meg az *uvr8-6* mutáns növények esetében.

Hasonló vizsgálatot végeztük olyan növényekkel is, melyek a *ProHYH:HYH-YFP* transzsgént *hy5hyh* és *hyh* hiánymutáns növényekben fejezik ki. A HY5 jelenléte nagyban hozzájárult a HYH-YFP fehérje felhalmozódásához, mivel jelentősen több HYH-YFP jelet adó sejtmagot észleltünk a *hyh* háttérű vonal metszeteiben, mint a *hy5hyh* háttérű transzgenikus vonalból származókban. A HYH-YFP gradiens a szárban már rövid, 4,5 órás UV-B kezelés hatására is kialakult.

Ezek az eredmények bizonyítják, hogy az UVR8 transzkripció szinten is elősegíti a szárokban megfigyelhető HY5 és HYH gradiens kialakulását. Kimutattuk továbbá, hogy a HY5-ra (és a HYH-ra) ható UVR8 jel nem terjed a megvilágított szövetekből az árnyékos oldaliak felé. Ez a fototropikus elhajlás alapjául szolgál, ugyanis a HY5 gátolja az auxin működését, ebben az esetben sokkal inkább a megvilágított oldalon, mint az árnyékos szárfélben. Az egyenlőtlen növekedés következménye, hogy a szár a besugárzás irányába hajlik.

UV-B indukált HY5-függő és HY5-független gének transzkripciója

Az EARLY LIGHT INDUCED PROTEIN 2 (ELIP2) fehérje a tilakoid membránok fotoprotekciójában játszik szerepet ezért az UV-B sugárzás hatására megnövekedő szintje a fotoszintetikus apparátus védelmét szolgálja. Az UV-B sugárzás serkenti az *ELIP2* gén működését, és ehhez szükség van UVR8 és HY5 fehérjére. Miután megfigyeltük, hogy a HY5 UVR8-től függő expresszió-indukciója szövetspecifikus úton működik, meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy az UVR8 által elindított jelátviteli utak HY5 után következő lépései is szövetautonómok-e. Ennek eldöntésére a *ProELIP2:GUS-GFP-NLS* transzsgént bejuttattuk a ProUVR8, ProML1 és a ProCAB3 vonalainkba, a vizsgálatokat pedig CLSM-mel végeztük. A *ProELIP2* aktivitás fehér fényben alacsony, az UV-B viszont drasztikusan megemeli, de csak azokban a sejtekben, amelyek tartalmaznak detektálható mennyiségű YFP-UVR8 fehérjét. Az eredmények alapján az UVR8 a HY5-függő *ELIP2* kifejeződést szövetspecifikusan szabályozza, nem tapasztaltunk szövetek közötti jelterjedést.

A PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9 (PRR9) a növényi cirkadián óra eleme. Kifejeződése mindamellett, hogy napi ritmust mutat, UV-B sugárzás által is szabályozott. Promóterének aktivitása UV-B hatására megemelkedik. Ez a jelenség függ az UVR8-től, de független a HY5-től. A *HY5* és az *ELIP2* promótereivel ellentétben a *ProPRR9* aktívan működött a fehér

fényben nevelt transzgenikus csíranövények szikleveleinek mezofill sejteiben. Ezt a *PRR9* aktivitást az UV-B sugárzás számottevően megemelte, de csak a mezofill sejtekben, ha tartalmaztak kimutatható mennyiségű YFP-UVR8 fehérjét. Érdekes, hogy nem tapasztaltuk sem a ProML1, sem a ProUVR8 vonal epidermiszében a *ProPRR9* promóter kimutatható mértékű aktivitás emelkedését, annak ellenére sem, hogy ezeknek a növényeknek van YFP-UVR8 az epidermiszükben. Ez a ProPRR9 sajátos működésének a következménye.

Ezek a megállapítások tovább erősítik a korábbi eredményeket, miszerint az UV-B hatására UVR8 által vezérelt jelátviteli utak lehetnek szövetspecifikusak, ráadásul az egyes jelátviteli útvonalakat egyéb faktorok is befolyásolhatják egyedi működési módjaik által. Azt is megállapíthatjuk, hogy az UVR8 jelátvitelben előforduló szövetspecifikus folyamatok nem mind eredeztethetőek a HY5 szövetautonóm működéséből.

Következtetések

A fényérzékelés során sok szövetspecifikus és szöveti autonómiát nem mutató folyamat játszódik le, elősegítve a megfelelő összetett válaszreakciók kialakulását. Ilyen folyamatok például a fotomorfogenikus növekedés gátlása, a fototropikus szárelhajlás, vagy a flavonoidok akkumulációja. Előállítottunk olyan növényi vonalakat, melyek az YFP-UVR8 fúziós fehérjét különböző szövetekben termelik *uvr8* háttérben, ezek felhasználásával vizsgáltunk UVR8-függő UV-B válaszreakciókat. Kísérleti eredményeink alapján a következő következtetéseket tehetjük:

- Az *UVR8* saját promóterével kifejeztetett YFP-UVR8 fehérje a csíranövények epidermisz és mezofill sejteiben biztosan termelődik.
- A mutáns komplementációs tesztek alapján megállapítható, hogy csíranövényekben a hipokotil megnyúlás gátlásában az epidermális és a mezofillben található UVR8 együttműködve vesz részt, míg a sziklevel növekedését kizárólag az epidermiszben található UVR8 fotoreceptor képes elősegíteni. Eredményeink alapján a hipokotil hosszára és a sziklevelek méretére a szállítószövetben termeltetett YFP-UVR8 (nagy valószínűséggel) nincs hatással.
- A fehér fényel együtt alkalmazott kiegészítő UV-B sugárzás hatására bekövetkező fotomorfogenikus és UV-B akklimációs válaszokat leginkább a felnőtt növények kortexében/mezofilljében lévő UVR8 képes elindítani, de a teljes válaszok kialakulásához szükséges az epidermiszben található UVR8 is.
- A klorofilltartalom emelkedését szintén leginkább a kortex/mezofill sejtekben található UVR8 indítja el, az UVR8 mennyiségével arányos mértékben.

- Csíranövényekben és felnőtt növényekben egyaránt megfigyelhető az UVR8-függő flavonoid felhalmozódás. Legnagyobb mennyiségben azokban a szövetekben termelődnek flavonoidok, amelyekben az UVR8 megtalálható, a teljes értékű védelem kialakulásához viszont szükség van a különböző szövetekben lejátszódó jelátviteli mechanizmusok összességére.
- Az egy irányból megvilágított felnőtt növények szárában megfigyelhető az UVR8-függő flavonoid felhalmozódás az UV-B-vel besugárzott oldalon. Ez arra utal, hogy az UVR8 ebben az esetben helyspecifikusan, a megvilágított szövetekben fejti ki hatását, nincs jelterjedés az árnyékos oldalra.
- Felnőtt növények esetében több esetben találtunk YFP-UVR8-at nem tartalmazó szövetekben is flavonoidokat, ami a flavonoidok mozgására, transzportjára utal, de csak az epidermisz felé.
- Felnőtt korban is fontos az epidermiszben található UVR8 a flavonoidok felhalmozásához, viszont a kortextben található UVR8-nak sokkal fontosabbá válik a szerepe, mint csíranövény állapotban. Az UVR8 fehérje mennyiségének is komoly hatása van a flavonoid felhalmozódás mértékére.
- Kimutattuk, hogy a flavonoid termelés egyik kulcsenzimét kódoló *CHS* gén UV-B indukciója csak azokban a sejtekben következik be, melyekben van aktív YFP-UVR8. Ez a génindukció lehet a flavonoid felhalmozódás okozója.
- Felnőtt növényeken megfigyeltük az unilaterális UV-B sugárzás irányába bekövetkező szárelhajlást. Ez hasonlít a csíranövények hipokotiljának korábban leírt reakciójára, azonban míg a felnőtt növényekben a folyamatot dominánsan irányító fotoreceptor az UVR8, addig a csíranövények válaszában a fototropinok szerepe hangsúlyosabb, vagyis változik a jelátviteli mechanizmus. A szár elhajlását UV-B sugárzás felé az epidermiszben és a mezofillben/kortextben termelődő UVR8 is kiváltja és az elhajlás mértékét befolyásolja az UVR8 mennyisége.
- Az UVR8 irányította jelátvitelben kulcsszerepet játszó HY5 fehérje felhalmozódása, valamint a *HY5* gén indukciója szövetautóm: a csíranövényeknek csak azokban a szöveiteiben következett be a génindukció és a HY5 szint emelkedése, amelyekben volt kimutatható mennyiségű UVR8. Ez azt bizonyítja, hogy ezekben a folyamatokban nincs szövetek közötti jelterjedés.
- Felnőtt növények szárában a HY5 és a vele homológ HYH felhalmozódása is UVR8-függő módon, csak az UV-B-vel megvilágított oldalon figyelhető meg. Mivel a HY5 az auxin növekedési hormon hatását helyspecifikusan gátolja, ez a jelenség hozzájárul a megvilágított és az árnyékos oldal között megfigyelhető egyenetlen auxin válaszhoz, aminek egyenetlen szárnövekedés, vagyis UV-B irányba megfigyelhető elhajlás a következménye.

- A HY5-függő *ELIP2* és a HY5 független *PRR9* génexpresszió UV-B általi megemelkedését az UVR8 váltotta ki, de csak azokban a szövetekben, amelyekben volt kimutatható mennyiségű YFP-UVR8. (Ez alól kivétel a *PRR9* epidermális indukciójának hiánya, ugyanis ez a gén ebben a szövetben nem indukálódik, de ez a *ProPRR9* sajátos működése miatt történik.) Ezek alapján az UVR8 által indított jelátviteli lépések szövetspecifitása nem csak abból eredhet, hogy a jelátvitelben kiemelt szereppel bíró HY5 felhalmozódása szöveti autonómiát mutat, mivel a HY5-től független *PRR9* szintén szövetspecifikusan indukálódik.

Összesítve az eredményeket megállapíthatjuk, hogy az UVR8 jelátviteli rendszerében szövetautonóm és szöveti specificitást nem mutató folyamatok egyaránt előfordulnak, ezek sokszor együttesen fejtik ki hatásukat a megfelelő összetett válaszok kialakulása érdekében. Az UVR8 jelátviteli rendszerének egyre részletesebb ismerete újabb és újabb lehetőségeket biztosít a további részfolyamatok autonómiájának felderítésére, így a jövőben számos alkalom fog nyílni kísérletek tervezésére az általunk is alkalmazott megközelítéssel. Ha ezeket a folyamatokat felderítjük, a jelátvitelhez tartozó komplex válaszreakciók manipulálhatósága egy magasabb szintre kerülhet, ugyanis UVR8 (esetleg más jelátvitelben szereplő receptorok), vagy egyéb faktorok adott szövet(ek)ben történő termeltetésével erősíthetőek, vagy gyengíthetőek lennének egyes részfolyamatok külön-külön is. Az UV-B jelátvitel alaposabb megismerése olyan tudással ruház fel bennünket, amivel elősegíthetjük a növények túlélését, akklimációját erősebb UV-B sugárzásban, vagy akár megfelelő, UV-B sugárzással kiegészített fénykezeléseknek köszönhetően erősíthetjük a növények kártevők elleni védekezését is. Ezeket az ismereteket természetesen a haszonnövények hatékonyabb termelésével kapcsolatban is tudnánk kamatoztatni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindenkinek, aki bármilyen formában segített a doktori értekezésem elkészítésében. Munkámat a GINOP-2.3.2-15-2016-00001, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00032 számú pályázat finanszírozta. Tanulmányaimat az MTA Fiala Kutató ösztöndíjjal támogatta.

Saját közlemények

Tudományos cikkek:

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Bernula P., Crocco C. D., Arongaus A. B., Ulm R., Nagy F., Viczián A. (2017).
Expression of the UVR8 photoreceptor in different tissues reveals tissue-autonomous features of UV-B signalling. *Plant Cell Environ. Jul;40(7)*, 1104-1114.
doi: 10.1111/pce.12904. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28058744 IF₂₀₁₇: 5,415

Hajdu A., Ádám É., Sheerin D. J., Dobos O., **Bernula P.**, Hiltbrunner A., Kozma-Bognár L., Nagy F. (2015). **High-level expression and phosphorylation of phytochrome B modulates flowering time in Arabidopsis.** *Plant J. Sep;83(5)*, 794-805.
doi: 10.1111/tbj.12926. Epub 2015 Jul 18. PMID: 26120968 IF₂₀₁₅: 5.468

Konferenciákon bemutatott poszterek:

Wodala, B., Ördög, A., Ayaydin, F., **Bernula, P.**, Horváth, F.
Investigating pathogen elicitor-induced stomatal responses in various plant species
11th Croatian Biological Congress Šibenik, 2012

Vanhaelewyn, L., Serrano, A., Viczián A., **Bernula, P.**, Prinsen, E., Arana, V., Ballaré, C.,
Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F.
Progressive alterations in ultraviolet-B induced phototropism during Arabidopsis development
Plant Biology meeting of American Society of Plant Biologists (ASPB), Honolulu, 2017

Vanhaelewyn, L., **Bernula, P.**, Van Der Straeten, D., Viczián A., Vandenbussche, F.
Ultraviolet-B induced phototropism in Arabidopsis inflorescence stems
Plant Biology meeting of American Society of Plant Biologists (ASPB), Montreal, 2018

MTMT azonosító: 10050867