

A K 68201, "A brasszinoszteroidok szerepének vizsgálata a növényi szervek morfogenezisének szabályozásában" c. kutatási projekt zárójelentése

Az OTKA projekt során a növények egyedfejlődésében és morfogenezisében fontos koordináló szerepet játszó brasszinoszteroidok (BR-ok, növényi szteroid hormonok) által kiváltott válszreakciókat befolyásoló szabályozási mechanizmusokat vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* modell növényen.

Munkánk egyik célkitűzése annak meghatározása volt, hogy a biológiailag aktív hormon milyen eloszlást mutat a kifejlett növény egyes szerveiben, illetve azok egyes régióiban. Korábbi - részben saját kutatásainkból származó - eredmények alapján már ismert volt, hogy a BR-ok a növény szervezetében nem transzportálódnak (Symons és Reid, 2004; Montoya és mtsai, 2005), és hogy a szintézis alapvető enzimeit kódoló gének meghatározóan a differenciálódó és növekedési régiókban expresszálódnak (Mathur és mtsai, 1998; Castle és mtsai, 2005; Montoya és mtsai, 2005). Ugyanakkor - elsősorban a hormon rendkívül alacsony szintje miatt - nem volt adat arra vonatkozóan, hogy a bioszintetikus gének lokális indukciója milyen tényleges hatással van az aktív BR formák (kasztaszteron és brasszinolid) eloszlására, felhalmozódására.

Egy, a hormonszint *in vivo* változásainak nyomon követésére alkalmas rendszer kialakítása érdekében olyan transzgenikus *Arabidopsis* vonalakat hoztunk létre, amelyekben a szentjánosbogár luciferáz riporter kifejeződését BR-regulált promóterek határozzák meg. Mivel kellő specificitást és expressziós változást csak negatív szabályozó elemekkel tudtunk elérni, ezért konstrukcióinkhoz szükséges volt olyan promóter szakaszok felhasználása is, amelyek a represszió észleléséhez szükséges konstitutív alap génaktivitást biztosíthattak. Mivel a *CaMV*, *35S* és *TUB2* promóterekkel létrehozott teszt konstrukciók egyike sem adott az elvárásainknak megfelelő egyenletes kifejeződést a különböző szervekben, további munkánkhoz egy egyszerű, mindössze négy G-box elemből álló mesterséges promóter szakaszt (Ishige és mtsai, 1999) használtunk. Ezt fuzionáltatva a BZR1 BR-függő represszor ötszörös kötőelemével olyan hormonálisan szabályozott promótert hoztunk létre, amely BR kezelést követően öt-tízszeres transzkripciós szint csökkenést mutat.

A munkánkkal egy időben megjelent publikációk (Guo és mtsai, 2010; Kim és Wang, 2010; Poppenberger és mtsai, 2011) felhívták a figyelmünket arra, hogy egyrészt a BR-reszponzív szekvenciához kötődő BZR1 transzkripciós regulátor más protein faktorokkal kölcsönhatásban fejti ki represszív hatását, másrészt a hormonális reguláció - egy még tisztázatlan mechanizmus folytán - a növekedési régiókban jelentősen csökkent mértékű. Ezek

az eredmények összhangban voltak azzal a megfigyelésünkkel, hogy riporter konstrukciónk a bioszintetikus gének igen magas aktivitása ellenére sem jelzett BR felhalmozódást a merisztematikus szövetekben. Így bár riporter vonalunkat sikerrel tudtuk használni a BR jelátvitelt gátló vegyületek hatásának 'screenelésére', ez a rendszer nem bizonyult alkalmasnak az endogén BR tartalom változásainak megbízható nyomkövetésére. Ennek fényében a továbbiakban az egyes szervek és szerv részek hormonszintjét közvetlen, analitikai módszerrel határoztuk meg.

Az izolált növényi részek hormon tartalmának GC-MS analízisével kimutatható volt, hogy az aktív BR formák (elsősorban a kasztaszeron) felhalmozódása szoros korrelációt mutat a bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD* és *CYP85A2* gének aktivitásának mértékével. Ennek megfelelően a legjelentősebb BR felhalmozódás a fiatal termésekben és a kialakuló virágzatban volt megfigyelhető. Nagyságrendileg alacsonyabb hormon tartalmat találtunk a növekvő levelekben és fellevelekben, és a legalacsonyabb szintet az idős szártagokban és a gyökérzetben. Adatainkból az egész növényre vonatkozó BR eloszlási térképet készítettünk.

A kémia BR analízissel párhuzamosan elvégeztük ugyanezen növényi részekben a BR bioszintézisért és inaktiválásért felelős gének expressziójának RT-PCR alapú vizsgálatát is. Ez feltárta, hogy a termés fejlődésének korai szakaszában erőteljesen indukálódik az *CYP85A1* gén, amelynek aktivitását korábban csak a csíranövény szakaszban tudtuk kimutatni (Castle és mtsai, 2005). Míg az általa kódolt enzim csak a kisebb specifikus aktivitású kasztaszeron szintézisére képes, a termés érése során később indukálódó *CYP85A2* hozza létre a magvakban erőteljesen felhalmozódó brasszolidot. Megállapítható volt továbbá, hogy a bioszintetikus gének expressziója alapvetően két sémát követ. Míg a *CYP85A1*, *CYP85A2* és *CYP90B1* elsősorban a generatív szervekben fejeződik ki, a *CYP90A1/CPD*, *CYP90C1* és *CYP90D1* főként a vegetatív szervekben aktív.

A hormonszinttel és a BR metabolizmus génjeinek regulációjával kapcsolatos vizsgálatokat befejeztük, és jelenleg az eredmények alapján készülő publikáció kéziratán dolgozunk.

A BR szintézis egyik kulcsenzimének számító *CYP90A1/CPD* leírásakor adataink azt valószínűsítették, hogy ez a citokróm P450 típusú monooxigenáz a szteroid oldallánc C-23 pozíciójának hidroxilációját végzi (Szekeres és mtsai, 1996). A későbbiekben viszont közvetlen biokémiai módszerrel azonosítottunk két C-23 enzimet (*CYP90C1* és *CYP90D1*) *Arabidopsis*-ban (Ohnishi és mtsai, 2006), ami arra utalt, hogy a CPD a BR szintézis valamelyik másik lépését katalizálhatja. A *cpd* mutáns növényben az intermedierek analízisével a szintézisút első reakciójában keletkező 22-hidoxikampeszterol erős

felhalmozódását lehetett kimutatni, jelezve, hogy a CPD enzim hiányában a hormon szintézis már annak kezdeti szakaszában elakad.

Vizsgálataink során meghatározva a szteroid váz korai 5 $\alpha$  redukciójáért felelős lépésében defektív *det2*, valamint a *cpd* mutánsok intermedier mennyiségeit, és egybevetve ezeket a kettős mutáns intermedier tartalmával, megállapítható volt, hogy utóbbi messzemenő egyezést mutat a *cpd* vonalával. Az, hogy a kettős mutánsban a BR spektrumot alapvetően a *cpd* mutáció határozza meg arra utalt, hogy ez a *det2*-höz viszonyítva episztatikus hatású, azaz a bioszintézist egy korábbi lépésnél inaktíválja. Ennek nyomán heterológ rendszerben kifejeztetett CPD enzim közvetlen biokémiai vizsgálatával kimutattuk, hogy az a szteroid A gyűrű C-3 pozíciójának oxidációját végzi, és várakozásunkkal egyezően valóban nem katalizál C-23 hiroxilációs reakciókat. A CPD a többi BR bioszintetikus P450 enzimhez hasonlóan több BR intermedier (22-hiroxikampeszterol, 22,23-dihiroxikampeszterol, kataszteron, teaszteron) oxidációjában is részt vesz, de erős preferenciát mutat a 22-hiroxikampeszterol szubsztrát iránt.

Korábbi eredményeink alapján egy olyan, a korábban feltételezettnél három reakcióval rövidebb BR bioszintézis utat javasoltunk, amely kampesztanol szintézis nélkül hoz létre brasszolidot, a biológiailag legaktívabb BR formát (Ohnishi és mtsai, 2006). Jelenlegi vizsgálataink kimutatták, hogy bár a *cpd* mutáció igen súlyos BR hiányt eredményez, az endogén kampesztanol szintjét nem befolyásolja. Ez fontos bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy modellünknek megfelelően a BR szintézis meghatározóan a kampesztanoltól független, rövidebb szintézisúton keresztül történik.

A CPD enzim szerepével kapcsolatos eredményeink alapján készült közleményt Journal of Biological Chemistry folyóirat közlésre elfogadta. Nyomtatott formában való megjelenése 2012 szeptemberében várható.

A BR bioszintézis fény általi szabályozásával kapcsolatos adataink jelezték, hogy a hormonválasz kialakulása és mértéke nem csupán a hormon aktuális szintjétől függ, hanem befolyásolja a hormonérzékenység szabályozottsága is (Bancos és mtsai, 2006). Ennek alapján vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy a BR receptort - mint a szignál út hormonnal közvetlenül kölcsönható elemét - kódoló *BRII* gén aktivitása hatással lehet-e a BR szuszceptibilitás mértékére. Azt találtuk ugyanis, hogy a *BRII* expressziója - az irodalomban gyakran idézett egyenletes kifejeződéssel (Friedrichsen és mtsai, 2000) szemben - differenciált fejlődés- és szervspecifikus mintázatot mutat.

Munkánk során a *BRII* aktivitást közvetlenül, RT-PCR módszerrel, és *BRII* promóter-luciferáz fúziót hordozó transzgenikus *Arabidopsis in vivo* lumineszcenciás analízisével

vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a csírázás folyamán a *BR11* gén erőteljesen indukálódik, és a hipokotilnak elsősorban a megnyúlási régiójában mutat magas aktivitást. A BR bioszintézis meghatározó génjei (*CPD*, *CYP85A1*, *CYP85A2*) ugyanebben a hipokotil szegmensben mutatnak maximális kifejeződést, ami összhangban van az intenzív sejtmegnyúlás BR-függésével. Figyelemre méltó volt emellett, hogy míg a fotomorfogenezis révén megnyúlásukban gátolt, fény-sötét ciklusokban nevelt csíranövényeknél a *BR11* expresszió szintje a korai indukciót követően már a harmadik napon jelentősen (mintegy felére) visszaesett, addig a sötétben nevelt csíranövények esetében hét-nyolc napig folyamatosan magas (a maximumhoz viszonyítva >70%) szinten maradt. Valamennyi esetben az erős kifejeződés a fokozott BR jelátvitelhez köthető fejlődési folyamatokkal mutatott időbeni és lokális egybeesést.

Vizsgálataink kimutatták, hogy a *BR11* transzkripciója fényben gátolt. A kifejeződés napi ciklusai során az expresszió maximuma a sötét periódus közepére esik. Ez a szabályozási mechanizmus szerepet játszhat a sötét fejlődés során a hipokotil BR-okkal szembeni érzékenyítésében. A reguláció ebben az esetben ellentétes a bioszintetikus génekével, amelyek egyértelműen fényindukáltak.

Kifejlett növények esetében a *BR11* kifejeződést promóter-*GUS* riporter fúziót hordozó transzgenikus vonalakon is vizsgáltuk. Ezeknél - a luciferázos megfelelőikhez hasonlóan - az expresszió elsősorban a fiatal levelekre lokalizálódott a vegetatív fejlődés során, míg a reproduktív szerveknél a bibében és a kialakuló magkezdeményekben volt erőteljes. A BR-regulált differenciációs folyamatok ez esetben is egyező lokalizációt mutattak a fokozott *BR11* kifejeződés helyeivel.

A szabályozott *BR11* expresszió morfogénikus jelentőségének igazolására olyan transzgenikus *Arabidopsis* vonalakat hoztunk létre, amelyekben a receptor génje jól karakterizált, szövetspecifikus promóterek szabályozása alatt, ektopikusan fejeződik ki. A kísérleti növények előállításához *bri1* mutáns hátteret használtunk, a génaktivitások könnyebb detektálása céljából pedig a *BR11* kódoló szekvenciát annak C-terminális végén transzlációsan fuzionáltattuk a luciferáz riporterrel. A kimérés kódoló szakasz a *bri1* mutánsban helyreállította a vad fenotípust, jelezve, hogy a fúzió során a receptor funkció maradéktalanul megőrződött.

Az ektopikus komplementációs kísérletek során a *BR11::LUC* transzgén *CAB3* (fotoszintetikus szövetekben megnyilvánuló), *SUC2* (szállítószövet-specifikus) és *ATHB8* (prokambium-specifikus) promóterekkel kapcsolatban transzformáltuk a növényekbe. Valamennyi transzgenikus *Arabidopsis* esetében ellenőriztük a kifejeződés

szövetspecifitását, majd az egyes vonalak fenotípusát részletesen elemeztük. A létrehozott növények minden esetben fertilisek voltak, és mindegyikre jellemző volt az egyes szervek aránytalan kifejlődése. A szállítószövethez köthető promóterek (*SUC2*, *ATHB8*) nem vagy alig biztosították a levelek megnyúlását, a virágzat és a termés esetében viszont szinte teljes komplementációt eredményeztek. A *CAB3* promóteres konstrukciónál viszont igen erős levél expanszió, de emellett csökkent méretű szírom és terméshossz volt megfigyelhető.

Adataink azt mutatják, hogy az *Arabidopsis* morfogénikus folyamatainak zavartalanságához szükséges a BR érzékenység finomhangolása. Ebben fontos szerepe van a *BRI1* expresszió transzkripció szintű szabályozásának, ami a szenzitivitás befolyásolásának feltehetően csupán egyik, de lényeges tényezője.

A *BRI1* expresszióval és BR szenzitivitással kapcsolatos eredményekből készült kézirat a *Planta* című folyóiratnál elbírálás alatt van.

Tekintettel arra, hogy a projekt eredményeit még csak részben tudtuk impakt faktoros folyóiratokban publikálni (egy cikkünk bírálati, egy másik pedig előkészületi stádiumban van), ezek figyelembe vehetőségét elősegítendő kérjük, hogy beszámolónk értékelésére lehetőség szerint az OTKA rendszere által még megengedhető későbbi időpontban kerülhessen sor.

Szeged, 2012. augusztus 31.