

Doktori értekezés

Andrási Norbert

**Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola**

**Szeged
2019**

Az Arabidopsis Hősök Faktor A4A szerepe a kombinált stresszválaszban

Ph.D. értekezés

Szerző: Andrási Norbert

Témavezetők: Dr. Szabados László és Dr. Rigó Gábor

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatika Kar

**Szeged
2019**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (lúdfű) modellnövény	8
1.2. Hőmérsékleti stressz.....	9
1.3. Sóstressz.....	10
1.4. Ozmotikus stressz	12
1.5. Reaktív oxigén származékok (ROS) és oxidatív stressz	13
1.6. Hősokk transzkripciós faktorok	16
1.7. Mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK).....	19
2. Célkitűzés	23
3. Anyagok és módszerek	24
3.1. Növényi anyagok és növénynevelés	24
3.2. Stresszkezelések.....	24
3.3. Génkonstrukciók létrehozása	25
3.4. <i>Arabidopsis</i> növények transzformálása és szelekciója	26
3.5. Túlélés teszt.....	27
3.6. Lipidperoxidáció	27
3.7. Intracelluláris lokalizáció	28
3.8. Bimolekuláris fluoreszcens komplementáció (BiFC) és fehérje detektálás.....	28
3.9. Nem-denaturáló PAGE, SDS-PAGE és Western blot analízis	29
3.10. Kromatin Immunprecipitáció (ChIP).....	30
3.11. RNS izolálás és kvantitatív PCR (qPCR) reakció.....	31
3.12. Fehérje foszforiláció <i>in vitro</i> tesztelése.....	31
3.13. Az MPK4 foszforilációs helyek <i>in vitro</i> azonosítása a HSFA4A fehérjén.....	32
3.14. <i>In vivo</i> foszforilációs helyek meghatározása.....	32
3.15. Adatelemzés és bioinformatikai módszerek.....	33
4. Eredmények	34
4.1. A HSFA4A génexpresszió és fehérje szint változása stresszkörülményekben.....	34
4.2. A HSFA4A transzkripciós faktor sejtmagi felhalmozódása	37
4.3. A HSFA4A fehérje promoter kötése.....	39

4.4. MAP kináz 4 (MPK4) foszforiláció <i>in vitro</i> körülményekben	41
4.5. <i>In vivo</i> foszforilációs helyek azonosítása	43
4.6. A HSFA4-típusú TF-ok foszforilációja a növényekben	45
4.7. A foszforiláció és a redox állapot hatása a HSFA4A fehérje multimerizációjára	46
4.8. A foszforilációt imitáló HSFA4A mutáns szerepe a stresszválaszban	49
5. Eredmények megvitatása	54
5.1. HSFA4A a transzkripciótól a sejtmagi lokalizációig	54
5.2. A HSFA4A transzkripció faktor része a MAP kináz jelátviteli útnak	56
5.3. Az azonosított foszforilációs helyek lehetséges szerepei	57
5.4. A <i>HSFA4A</i> túltermelése javítja a növények stressz toleranciáját	58
5.5. A HSFA4A egy fontos szabályozó egység a stresszválaszban	58
6. Köszönetnyilvánítás	61
7. Irodalomjegyzék	62
8. Összefoglaló	77
9. Summary	79
10. Publikációs lista	81
11. Függelék	83

Rövidítések jegyzéke

ABA	Abszcizinsav (Abscisic acid)
ABF	ABA-érzékeny elemet kötő faktor (ABA-responsive element binding factor)
ABI	ABA érzéketlen (ABA Insensitive)
AKT	<i>Arabidopsis</i> K ⁺ transzporter (<i>Arabidopsis</i> K ⁺ transporter)
AREB	ABA-érzékeny elemet kötő fehérje (ABA-responsive element binding protein)
BiFC	Bimolekuláris Fluoreszcens Komplementáció (Bimolecular Fluorescence Complementation)
CaMKII	Kalcium/Kalmodulin-függő protein kináz II (Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II)
CAMTA	Kalmodulin-kötő transzkripció aktivátor (Calmodulin-binding transcription activator)
CBF	C-repeat kötő faktor (C-repeat binding factor)
CDC2	Sejtosztódást szabályozó 2 (Cell division control 2)
CDK	Ciklin-függő kináz (Cyclin-dependent kinase)
CDPK	Kalcium-függő protein kináz (Calcium-dependent protein kinase)
ChIP	Kromatin Immunprecipitáció (Chromatin Immunoprecipitation)
ChIP-seq	Kromatin Immunprecipitáción alapuló szekvenálás
CK	Kazein kináz (Casein kinase)
COR15A	Hideg-szabályozott 15A (Cold regulated 15A)
CRT	C-ismétlődő elem (C-repeat)
CTR1	Konstitutív hármass válasz 1 (Constitutive triple response 1)
DAP-seq	DNS affinitás tisztításon alapuló szekvenálás (DNA affinity purification sequencing)
DRE	Kiszáradás-érzékeny elem (Dehydration-responsive element)
DREB	DRE-kötő fehérje (Dehydration-responsive element binding)
DTT	Dithiothreitol
EDR1	Fokozott fertőzés rezisztens 1 (Enhanced disease resistance 1)
ERD1	Korai kiszáradásra érzékeny 1 (Early responsive to dehydration 1)
ERF	Etilén válaszáért felelős faktor (Ethylene response factor)
ERK1	Extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1 (Extracellular signal-related kinase 1)
GSK3	Glikogén szintáz kináz 3 (Glycogen synthase kinase 3)
GST	Glutathion S-transzferáz (Glutathione S-transferase)
HAK	Magas affinitású K ⁺ transzporter (High affinity K ⁺ uptake)

HSE	Hősokk elem (Heat shock element)
HSF	Hősokk faktor (Heat shock factor)
HSFA4A	Hősokk faktor A4A
HSP	Hősokk protein (Heat shock protein)
ICE	CBF expresszió szabályozó (Inducer of CBF expression)
IP	Immunprecipitáció
KT	K ⁺ transzporter
KUP	K ⁺ permeáz (K ⁺ uptake permease)
LCT1	Alacsony affinitású kation transzporter 1 (Low-affinity cation transporter 1)
MAP3K	MAP kináz kináz kináz (MAPKKK)
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz (MAP-kináz, MPK)
MBP	Maltóz-kötő fehérje (Maltose binding protein)
MDA	Malondialdehid
MEKK1	MAPK/ERK kináz kináz 1
MKK	MAP kináz kináz (MAP2K, MAPKK)
MKP	MPK-specifikus foszfatáz (MPK-specific phosphatase)
MS	Murashige és Skoog
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilén-glikol
PKA	Protein kináz A (cAMP-függő protein kináz)
PLK1	Polo-típusú kináz 1 (Polo-like kinase 1)
RAF	Gyors aktivációjú fibrosarkóma (Rapidly activated fibrosarcoma)
RLK	Receptor-szerű protein kináz (Receptor-like protein kinase)
ROS	Reaktív oxigén származékok (Reactive oxygen species)
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
SRK	SNF1-kapcsolt protein kináz (SNF1-related protein kinase)
TBA	Tiobarbitursav (Thiobarbituric acid)
TBARS	Tiobarbitursav reaktív anyagok (TBA-reactive substances)
TCA	Triklórecetsav (Trichloroacetic acid)
TF	Transzkripció Faktor
Wt	Vad típus (Wild type)
YFP	Sárga Fluoreszkáló Fehérje (Yellow Fluorescent Protein)

1. Bevezetés

A globális felmelegedés okozta klímaváltozás egyre inkább kihat az élővilágra és az emberi tevékenységekre, és befolyásolja a növénytermesztést is. A gyorsan változó környezeti hatások megnehezítik az élőlények, így a növények alkalmazkodását és túlélését is. Stressznek nevezhetjük azokat a környezeti hatásokat, amelyek megakadályozzák a növény saját genomja által biztosított lehetőségek megfelelő kihasználását (Taiz és mtsai., 2015). A természetben többféle biotikus és abiotikus stressz fordul elő, mint például patogénfertőzések, szárazság, fény-, hő-, nehézfém- és sóstressz, melyek gyakran egyidejűleg hatnak a növényekre, így befolyásolva azok növekedését, fejlődését, szaporodását és terméshozamát (Suzuki és mtsai., 2014). A növények a helyhez kötött életmódjukból adódóan, rugalmas molekuláris és fiziológiai alkalmazkodóképességet fejlesztettek ki a különböző negatívan ható környezeti stressz kivédésére (Yoshida és mtsai., 2015). Ennek következtében a növények számtalan stresszhelyzetben képesek helytállni, de több környezeti tényező együttes hatása, vagyis a kombinált stressz, próbára teszi a növények alkalmazkodóképességét. Kutatások kimutatták, hogy a kedvezőtlen környezeti feltételek kombinációja nagyobb kárt okozhat a növényekben, mint az egyesével fellépő hatások (Rizhsky és mtsai., 2004b; Suzuki és mtsai., 2014). A hőstressz és a szárazság kombinációja akár letális is lehet a növényekre, hiszen a szárazság a légzőnyílások záródásához vezet, ezáltal azonban csökken a párologtatás, mely a levelek felszíni hőmérsékletét csökkentené a hőstressz során (Rizhsky és mtsai., 2004b). Kombinált stressz során nem csak az egyedi stresszre jellemző gének aktiválódnak, hanem akár egy teljesen más génexpressziós mintázat is megjelenhet, mely eltérő metabolikus változásokat eredményezhet a növényekben (Rasmussen és mtsai., 2013; Sewelam és mtsai., 2014; Georgii és mtsai., 2017). Például a só- és hőstressz kombinációja olyan specifikus metabolikus változásokat okozhat, amely hatással van az ionegyensúlyra, vízháztartásra, fotoszintetikus aktivitásra és a stresszválaszban szerepet játszó anyagcseretermékek termelésére, azonban ezek nem kifejezetten csak a só- vagy csak a hőstresszre jellemzőek (Rivero és mtsai., 2014). Megfigyelték azt is, hogy só-, mannitol- és hőstressz kombinációja alatt, általában a só- és hőstresszre indukálódó gének expressziója magasabb, míg az ozmotikus stresszre indukálódó géneké alacsonyabb. A kutatások alapján elmondható, hogy a kombinált stressz által kiváltott válasz nem csak az egyedien ható stressz által kiváltott stresszválaszok összegződése (Sewelam és mtsai., 2014), illetve az egyedi stresszválaszokra jellemző transzkript szintű változásokból nem lehet egyértelműen következtetni a kombinált stressz esetén fellépő transzkript változásokra (Rasmussen és mtsai., 2013). Több vizsgálat kimutatta, hogy a növényekben

végbemenő epigenetikai változások szerepet játszanak olyan környezeti stressz kivédésében, mint például a szárazság, só-, hideg- és hőstressz (Kim és mtsai., 2015). Ilyen epigenetikai változások lehetnek a kromatin módosulások. Ezek főként DNS metilációval, valamint a hisztonfehérjék acetiláció-, metiláció-, foszforiláció- vagy akár szumoilációjával valósulhatnak meg. Valószínűleg már nem kell sok időnek eltelnie, hogy az epeigenetikai változások szerepét a kombinált stresszben is kimutassák.

A napjainkban felgyorsuló klímaváltozás miatt, nélkülözhetetlenek a kombinált stresszel kapcsolatos alap kutatások, illetve az ott kapott eredmények mielőbbi hasznosítása. Kutatásom során a csoportban azonosított hősokk faktor A4A (HSFA4A) jellemzését folytattam, *Arabidopsis thaliana* modellnövény segítségével, mely során kimutattam, hogy e transzkripció faktor fontos szerepet tölt be az egyedi és a kombinált stresszválasz kialakításában.

1.1. *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) modellnövény

A lúdfű, tudományos nevén *Arabidopsis thaliana*, a keresztesvirágúak családjába tartozó, egynyári, száraz gyepeken előforduló, sok magot (5-10,000) hozó gyomnövény (Simon, 1994), mely több előnyös tulajdonsággal rendelkezik, ami miatt modellnövényként használják a növénybiológiai kutatásokban. A kifejlett *Arabidopsis* növény kis mérete és rövid életciklusa lehetővé teszi a nagyobb volumenű laboratóriumi kutatások kivitelezését. A legelterjedtebb *Arabidopsis* ökotípus a Columbia, melynek teljes genomszekvenciáját 2000-ben készítették el az Arabidopsis Genome Initiative 2000 program keretén belül. A lúdfű kromoszómaszáma alacsony ($n=5$), a zárvatermő növények között a genom mérete az egyik legkisebb, kb. 135 megabázis (Greilhuber és mtsai., 2006). Mindemellett az *A. thaliana* óriási előnye a nagyszámú utód és önbeporzás, ami a genetikai mutációs kísérletekben rendkívül fontos. Az *Arabidopsis* genomja alacsony metiláltsági (6-7%) foka mellett viszonylag kevés ismétlődő (20-25%) szekvenciát tartalmaz (Meyerowitz, 1992). Jelenleg körülbelül 27,000 génről tudunk, mely 37,000 különböző fehérjét kódol. A lúdfű hatékony *Agrobacterium*-közvetített genetikai transzformációjának kidolgozása lehetővé tette a transzgenikus növények létrehozását (például túltermelő növények), illetve különböző T-DNS inszerciós génmutációk izolálását (Koncz és mtsai., 1992; Clough és Bent 1998; Koncz és mtsai., 2012). Az *Arabidopsis thaliana* modellen végzett kutatások során nyert ismeretek sokszor hatékonyan felhasználhatók a mezőgazdaságban és iparban egyaránt.

1.2. Hőmérsékleti stressz

A hőmérsékleti stressz az egyik leggyakrabban előforduló negatív környezeti hatás az élőlények élete során. A növények már a kis hőmérsékleti ingadozásokra is érzékenyek, és ezek a változások hatással lehetnek a növekedésükre és fejlődésükre (Lee és mtsai., 2012). Alapvetően kétféle hőmérsékleti stresszt különböztethetünk meg, az alacsony hőmérsékletit, mely lehet hideg vagy fagyás stressz, illetve a magas hőmérsékletit, vagy másnéven hőstresszt (Shinozaki és mtsai., 2015). A legtöbb növénynél a hidegstressz 20°C alatti hőmérséklet esetén jelentkezik, mely során megjelennek a hideg által okozott károsodások, mint például a csökkent membránfluiditás, melynek velejárója a membránfehérjék rendellenes működése (Chinnusamy és mtsai., 2007). Nulla fok alatti hőmérsékletnél már fagyás stresszről beszélünk, ekkor az apoplastikus víz megfagy, mely egyfajta védelmet nyújt a citoplazmában található sejtalkotóknak, ugyanakkor csökkenti a vízpontenciált, mely a sejtek kiszáradásához vezethet. Egy hosszabb fagyás stressz során jégkristályok alakulhatnak ki a sejteken belül, mely a membránok és sejtservecskék fizikai károsodását okozzák (Shinozaki és mtsai., 2015). A növények hideg akklimatizáció segítségével próbálják elkerülni a fagyás stresszt, mely folyamat során alacsony, de nem fagypontra alatti hőmérsékleten, olyan mechanizmusokat indítanak be, amelyek növelik a fagytoleranciát (Xin és Browse, 2000). *Arabidopsis*-ban a legjobban tanulmányozott hideg akklimatizációs rendszer a CBF/DREB jelátviteli kaszkád, mely transzkripciós, poszt-transzkripciós és poszt-transzlációs szabályozásokon alapszik (Chinnusamy és mtsai., 2007). A kaszkád legfontosabb elemei a *CBF1* és *CBF2* gének (Chinnusamy és mtsai., 2003), illetve a szabályozó szerepet betöltő DREB1b, DREB1c és DREB1a transzkripciós faktorok (Liu és mtsai., 1998). A hidegstressz indukált CBF rendszert több transzkripciós faktor szabályozza, mint az ICE1, ICE2 és CAMTA3 (Chinnusamy és mtsai., 2003), ezenkívül, a MYB96 transzkripciós faktor összekapcsolja az abszcizinsav (ABA) és a hidegstressz által indukált jelátviteli utakat (Lee és Seo, 2015). A legújabb kutatások kimutatták, hogy az ERF105 transzkripciós faktoron keresztül az etilén jelátviteli útnak is szerepe van a hidegre adott stresszválaszban, melynek működése hideg-indukált és kapcsolatban van a CBF rendszerrel (Bolt és mtsai., 2017).

A hőstressz súlyosabb következményekkel jár, hiszen már az optimálisnál egy kicsit is magasabb hőmérséklet jelentősen befolyásolhatja a növények fejlődését és szaporodását, ezáltal a terméshozamot (Mittler és Blumwald, 2010). A magas hőmérséklet növeli a membránfluiditást, mely a membránok csökkent integritását és károsodását okozza, ami a sejtlegzés valamint a fotoszintézis leállításához vezethet (Taiz és Zeiger, 2010; Shinozaki és

mtsai., 2015). A hőstressz emellett befolyásolja az RNS és a fehérjék stabilitását, elősegíti a hibás fehérje szerkezetek és a fehérje aggregátumok kialakulását, illetve fokozza az enzimek rendellenes működését és a reaktív oxigén származékok (ROS) felhalmozódását (Larkindale és Knight, 2002; Lee és mtsai., 2012). A hőstressz által kiváltott stresszválasz gyors és olyan védelmi mechanizmusokat foglal magába, melyek konzerváltak az eukarióta szervezeteken belül (Anckar és Sistonen, 2011). A hőstressz elsődleges szabályozói a hősokk faktorok (HSF), melyek a gyors stresszválasz során elsősorban a hősokk proteinek (HSP) aktiválják. A hősokk proteinek, molekuláris chaperonként működve, megóvják a fehérjéket a denaturálódástól és megakadályozzák a fehérje aggregátumok képződését (Ohama és mtsai., 2016). Molekulasúlyuk alapján öt hősokk protein különíthető el: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 és kis HSP (Al-Whaibi, 2011; Park és Seo, 2015). A HSP-k főleg a citoplazmában fordulnak elő, de jelenlétüket kimutatták a sejtmagban, mitokondriumban, kloroplasztisban és az endoplazmatikus retikulumban is (Park és Seo, 2015). A szárazsághoz hasonlóan, a hőstressz is aktiválja a DRE/CRT elemeket kötő transzkripciós faktorokat, mint a DREB2A, ami a stresszválaszban szerepet játszó gének expresszióját szabályozza (Sakuma és mtsai., 2006). Ugyanakkor kimutatták, hogy a DREB2A működése, ezáltal a célgének aktivációjában betöltött szerepe, függ a fehérjében található NRD (negatív szabályozó domén) régió foszforilációs állapotától (Sakuma és mtsai., 2006; Mizoi és mtsai., 2019). A stresszválasz kialakításában a foszforiláció máshol is szerepet játszik. *Arabidopsis*-ban a legjellemzőbb hőstressz-aktivált kináz az MPK6, mely a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) kaszkád része és többek között a hőstressz-indukált programozott sejthalál szabályozásában is részt vesz (Li és mtsai., 2012b). Ezenkívül a növényi hormonok, mint az ABA, szalicilsav és etilén, is meghatározó szereplők a hőstressz elleni védelemben (Larkindale és Huang, 2004). Az ABA, a légzőnyílások szabályozása mellett (Vysotskaya és mtsai., 2010), a hősokk faktorok génexpressziójára is hatással lehet (Chauhan és mtsai., 2011).

1.3. Sóstressz

A termőföldek sótartalmának növekedése az egyik legjelentősebb környezeti stressz, amely súlyos károkat okoz a mezőgazdaságban. A talaj szikesedésének következtében a 21. század közepére a növénytermesztésre alkalmas területek akár 50%-a is eltűnhet (Wang és mtsai., 2003). A talaj sótartalmának növekedését az esőzések, a párolgás és az erózió által kialakított természetes szikesedés mellett, főleg az ember által alkalmazott intenzív locsolás és a párolgás együttes hatása okozza (Mahajan és Tuteja, 2005; Garg és Manchanda, 2008). A sós

talajok meghatározóan NaCl-ot és Na₂SO₄-ot tartalmaznak, de számottevő mennyiségben lehet jelen CaCl₂, MgCl₂, CaSO₄ és MgSO₄ is (Szabolcs, 1974), melyek nem csak a haszonnövényekre, de a természetben előforduló más növényekre is negatív hatással vannak (Parihar és mtsai., 2015). A természetben elkülönítünk sótűrő és sóérzékeny növényeket, azaz halofitákat és glikofitákat (Taiz és mtsai., 2015). A NaCl felhalmozódásnak van a legnagyobb károsító hatása, mely az ozmotikus stressz mellett ion toxicitást idéz elő a növényekben (Kader és Lindberg, 2010). A nátrium-klorid okozta ozmotikus stressz következtében növekszik a gyökérsejtek vízpotenciálja, míg a talajé csökken, ezért a növények nem képesek a víz és az abban oldott ásványi anyagok felvételére, ezáltal a sejtek vízhiányos állapotba kerülnek és kiszáradhatnak, illetve anyagcsereproblémák jelentkezhetnek (Mahajan és Tuteja, 2005; Taiz és mtsai., 2015). Ugyanakkor a Na⁺ és Cl⁻ ionok bejutnak a sejtekbe, ahol káros hatással vannak a membránokra, az enzimek működésére, a citoplazmában végbemenő anyagcserefolyamatokra és a fotoszintézisre. Másodlagos hatás a ROS felhalmozódás, ami gátolja a növények fejlődését és növekedését, illetve a megfelelő védőmechanizmusok beindulása nélkül azok halálához vezethet (Kader és Lindberg, 2010; Taiz és mtsai., 2015). A sóstressz során főként a kloroplasztiszban és a mitokondriumban keletkeznek ROS-ok, mint a szuperoxid anion, hidrogén-peroxid és hidroxilgyökök, melyek oxidatív károsodást okoznak (Masood és mtsai., 2006). A K⁺ ionoknak fontos szerepe van a növények metabolizmusában és kofaktorként elengedhetetlen bizonyos enzimek működéséhez, azonban sóstressz során a K⁺/Na⁺ arány egyensúlya felborul, befolyásolva a sejtek megfelelő működését. Normál körülmények között a kálium 100-200 mM, míg a nátrium kevesebb, mint 10 mM koncentrációjú a növényi sejtekben (Kader és Lindberg, 2010). A Na⁺ ionok a nem-szelektív kation csatornákon (NSCC) és a magas affinitású kálium transzportereken (HKT) keresztül jutnak be a sejtekbe. A Na⁺ felvételben az LCT1, KUP/HAK/KT és az AKT családba tartozó transzporterek is szerepet játszhatnak. A megfelelő K⁺/Na⁺ arány fenntartásához a NHX1 (Na⁺/H⁺ exchanger) és SOS1 (Salt Overly Sensitive) Na⁺/H⁺ antiporterek szükségesek, melyek a vakuólumba és a sejten kívüli térbe juttatják a felesleges Na⁺ ionokat. Mindkét antiporter aktiválásában részt vesz a Ca²⁺, ami az NHX1-et közvetlenül, a SOS1-et viszont az SOS jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja. A SOS rendszerben a SOS3 kalcium-kötő fehérje és a SOS2 protein kináz is részt vesz: a sóstressz során felhalmozódó Ca²⁺ a SOS3 fehérjén keresztül aktiválja a SOS2 kinázt, ami a SOS1 antiportert foszforilálja és aktiválja. Az NHX1 működését az ABA is befolyásolja (Lee és mtsai., 2004; Shinozaki és mtsai., 2015). A növényi hormonok, mint az ABA, auxin, citokinin, etilén, jázmonsav, szalicilsav és brasszinoszteroidok is fontos szerepet játszanak a sóstressz kivédésében, aktiválva a különböző stressz géneket és jelátviteli utakat, mint például

a MAPK kaszkádot, ugyanakkor képesek szabályozni a transzportereket és az antioxidáns rendszert is (Fahad és mtsai., 2015). A sóstesz által is kialakított oxidatív károsodás enyhítésére a növények enzimatis és metabolikus antioxidáns rendszereket használnak (Prochazkova és Wilhelmova, 2007; Munns és Tester, 2008). Az antioxidáns rendszerhez tartozó glutation transzferázok (GST) több stresszvásban is szerepet játszanak, fenntartva az aszkorbát és glutation egyensúlyt, ezáltal a sejtek megfelelő redox állapotát. Paradicsomban kimutatták, hogy a glutation transzferázoknak fontos szerepe van a sótolerancia és a szalicilsav-indukált stresszvás kialakításában (Csiszár és mtsai., 2014).

Érdekességképpen elmondható, hogy a külsőleg adagolt etanol növeli az *Arabidopsis* növények sótoleranciáját, olyan ROS-indukált gének aktivációján keresztül, mint a *ZAT10* és *ZAT12*. Ezen faktorok a ROS detoxifikációban szerepet játszó enzimek (APX1, APX2) működését szabályozzák. (Nguyen és mtsai., 2017).

1.4. Ozmotikus stressz

A növények növekedésének és fejlődésének egyik legfőbb korlátozó tényezője az ozmotikus stressz, hiszen ezt több abiotikus stressz is előidézheti, mint a szárazság, alacsony hőmérséklet vagy akár a talaj megnövekedett sótartalma is (Lee és mtsai., 2004). Az ozmotikusan aktív anyagok, mint például nátrium-klorid, talajban történő felgyülemzése a növények gyökérsejtjeinek vízpotenciál növekedését eredményezik, ennek következtében vízhiányos állapot lép fel, ami a sztómák záródásához, a levélfelület csökkenéséhez vezethet. Ezenkívül megfigyelhető a csökkent fotoszintetikus aktivitás és a reaktív oxigén származékok felhalmozódása, melyek végül a sejtek rendellenes működéséhez és halálához vezethetnek (Taiz és mtsai., 2015). A szárazság szintén ozmotikus stresszt képes kiváltani, mely beindíthatja a sztómazáródást. A növények bizonyos mértékig képesek alkalmazkodni a megváltozott víz hozzáféréshez, ez azonban egy sor jellegzetes élettani és biokémiai változással jár (Yoshida és mtsai., 2006). A stresszvás során több védőfehérje (pl. detoxifikációs és metabolit enzimek, LEA (Late Embryo Abundant) és dehidrin) és ozmoprotektáns molekulák (pl. prolin, glicinbetain és mannitol) felhalmozódása figyelhető meg (Hare és mtsai., 1998; Taiz és mtsai., 2015). Ozmotikus stressz hatására több jelátviteli út is aktiválódik, mely a másodlagos hírvivő molekulák, mint a Ca^{2+} , a reaktív oxigén származékok és az inozitol-foszfátok megemelkedéséhez vezet, melyek továbbítják a keletkezett jelet, majd foszforilációs kaszkádokon (MAPK, CDPK – kalcium-függő protein kináz) és foszfatázokon keresztül beindítják a célgének expresszióját. A jelátviteli utak lehetnek ABA-függőek (pl. RD29B,

RD22), illetve ABA-függetlenek (pl. ERD1, COR15A), melyek közül néhányat az alacsony hőmérséklet is befolyásol (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Az ozmotikus stresszválaszban különböző transzkripciós faktorok (DREB1/CBF, MYB, MYC), iontranszporterek (AtHKT1), protein kinázok (SnRK2) és egyes foszfatázok (ABI1, ABI2) vesznek részt (Seki és mtsai., 2003). A sztómazáródás folyamata szintén végbemehet ABA-függő és független módon egyaránt. Abszcizinsav jelenlétében az SRK2E/OST1 protein kináz felszabadul az ABI1 foszfatáz gátlása alól és működése során beindul a sztómazáródás folyamata, míg ABA hiányában az enyhe ozmotikus stressz közvetlenül képes indukálni a működését (Yoshida és mtsai., 2006). Yoshida és mtsai., (2015) kimutatták, hogy az ABA jelátvitelben résztvevő SRK2D/E/I kinázok az AREB1, AREB2 és ABF3 mellett az ABF1 bZIP típusú AREB/ABF transzkripciós faktor működésére is hatással vannak ozmotikus stressz során.

1.5. Reaktív oxigén származékok (ROS) és oxidatív stressz

A reaktív oxigén származékok keletkezése az aerob folyamatok természetes velejárója, azonban a kedvezőtlen környezeti feltételekkel termelődésük fokozódhat és másodlagos stresszt, azaz oxidatív károsodást okozhatnak. A ROS-oknak, azonban nem csak károsító hatásuk van, hiszen a növények aktívan termelik őket, és mint jelmolekulák részt vesznek a programozott sejthalálban, az abiotikus stresszválaszban, a patogének elleni védelemben és különböző jelátviteli utakban (Mittler, 2002). A reaktív oxigén származékok az oxigén részleges redukálásából származnak, így létrejöhet szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), hidrogén-peroxid (H_2O_2), szuperoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxil (HO^{\cdot}) és perhidroxil ($\text{HO}_2^{\cdot-}$) anion, melyek a sejtek oxidatív károsodását eredményezhetik (Asada és Takahashi, 1987; Asada, 2006). A ROS-ok főbb keletkezési helyei a kloroplastszisztemok (PSI és PSII fotokémiai rendszerek) és a mitokondriumok (I és III komplexek), ezenkívül a peroxiszómák és a plazmamembránban található NADPH oxidázok működése során is termelődik szinglet oxigén, hidrogén-peroxid és szuperoxid anion (Asada, 2006; Shinozaki és mtsai., 2015). A reaktív oxigén származékok felezési ideje változó, és ez hatással van a sejten belül és kívül megtett távolságokra, ezáltal a jelátvitelben betöltött szerepükre. A fotoszintézis és mitokondriális légzés során keletkező ROS-ok például szerepet játszanak a sejtmagi retrográd jelátvitelben (Shinozaki és mtsai., 2015). A hidrogén-peroxid, melynek felezési ideje a leghosszabb, másodlagos hírvivőként fontos szerepet tölt be a stressz-jelátvitelben, így alapvető a megfelelő molekuláris válasz kialakításában számos biotikus és abiotikus stressz körülményben (Volkov és mtsai., 2006; Baxter és mtsai., 2014; Mittler és

Blumwald, 2015). Kimutatták, hogy a reaktív oxigén származékok nemcsak az egyedi stresszekben, de a különböző kombinált stressz kivédéséhez szükséges stresszválasz kialakításában is elengedhetetlenek (Choudhury és mtsai., 2017). A ROS-ok, ugyanakkor magas reakcióképességüknek köszönhetően, károsíthatják a membránokat (lipidperoxidáció), a nukleinsavakat (DNS és RNS) és a proteineket, melyet sejthalál követhet (Mittler, 2002). A legtöbb környezeti stressz ROS felhalmozódást és ennek következtében az oxidatív stressz kialakulását eredményezheti. A ROS felhalmozódás mértéke nagyban függ a ROS termelés és ROS semlegesítés közötti egyensúlytól (Mittler és mtsai., 2004). Szárazság és sóstressz idején a megfelelő ROS homeosztázis fenntartása kifejezetten fontos a növények túléléséhez, főleg ha ezek mellé magas hőmérséklet vagy fény is társul (Miller és mtsai., 2010). A ROS semlegesítésre és a megfelelő egyensúly fenntartására a növények kifejlesztettek egy antioxidáns védelmi rendszert, melynek enzimatis és nem-enzimatis komponensei is vannak (Shinozaki és mtsai., 2015). Az antioxidáns rendszer működése függ a környezeti feltételektől (fényintenzitás, hőmérséklet, stb.), a stressz erősségétől és hosszától, illetve a sejtek és szövetek alkalmazkodóképességétől (Miller és mtsai., 2010). A legfontosabb nem-enzimatis antioxidánsok az aszkorbinsav (C-vitamin), redukált glutation (GSH), α -tokoferol (E-vitamin) és karotenoidok, ugyanakkor a poliaminok és a flavonoidok is szerepet játszanak a ROS-ok elleni védelemben. Az enzimatis antioxidáns védelem főbb szereplői a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimek, illetve a peroxiredoxinok (PrxR) (Apel és Hirt, 2004; Dietz és mtsai., 2006; Shinozaki és mtsai., 2015). A ROS detoxifikáció során a GSH glutation-diszulfiddá (GSSG), míg az aszkorbinsav monodehidroaszkorbáttá és dehidroaszkorbáttá oxidálódik, majd az aszkorbát-glutation cikluson keresztül visszaalakulnak redukált molekulákká. Ez a mechanizmus főleg a kloroplasztiszban játszódik le. A plasztiszokat a xantofillekhez tartozó zeaxantin is védi az oxidatív károsodástól. Enzimatis oldalról elsőként a SOD aktiválódik, mely hidrogén-peroxiddá alakítja a szuperoxid aniont, majd a CAT és APX átalakítja a hidrogén-peroxidot vízzé. A glutation-peroxidáz (GPX) működése során a hidrogén-peroxidból szintén víz keletkezik, melyhez GSH-t használ. Közvetett módon az aszkorbát-glutation ciklus enzimjei, mint a glutation-reduktáz (GR), dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) és monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDAR) is részt vesznek a ROS semlegesítésben (Mittler, 2002; Shinozaki és mtsai., 2015). A GPX a hidrogén-peroxid detoxifikációja mellett, a sejtek redox-homeosztázisát is szabályozza a tiol/diszulfid és a NADPH/NADP⁺ (redukált/oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) egyensúly fenntartásával (Bela és mtsai., 2015). Az 1. Táblázat és a 2.

Táblázat az antioxidáns enzimek működési helyét, illetve az antioxidánsok és antioxidáns enzimek működését kiváltó stresszeket mutatják be.

1. Táblázat. Az antioxidáns enzimek működési helye. (Shinozaki és mtsai., 2015 alapján)

Antioxidáns enzim	Rövidítés	Szubcelluláris lokalizáció
Azorkorbát-peroxidáz	APX	Citoszol, mitokondrium, plasztid, peroxiszóma
Kataláz	CAT	Peroxiszóma
Dehidroazorkorbát-reduktáz	DHAR	Citoszol
Glutation-reduktáz	GR	Citoszol, mitokondrium, plasztid
Glutation-peroxidáz	GPX	Citoszol, mitokondrium, plasztid
Monodehidroazorkorbát-reduktáz	MDAR	Citoszol, mitokondrium, plasztid
Peroxiredoxin	PrxR	Kloroplasztisz, mitokondrium
Szuperoxid-dizmutáz	SOD	Citoszol, peroxiszóma, plasztid, mitokondrium

Az abiotikus és főleg biotikus stresszválasz kialakításában jellemzően a plazmamembrán lokalizált NADPH oxidázok által termelt ROS-ok vesznek részt (Torres és Dangl, 2005). Kimutatták, hogy több olyan résztvevő van a jelátviteli utakban, melyek képesek érzékelni a ROS változást. Ilyen ROS-indukált jelátviteli komponens például a MAPK kaszkád, kiemelten a kaszkádban résztvevő AtANP1 és NtNPK1 MAP3K kinázok, illetve az AtMPK3/6 és Ntp46MAPK MAP kinázok (Kovtun és mtsai., 2000; Samuel és mtsai., 2000). Élesztőben végzett kutatások alapján azt feltételezik, hogy egy két-komponensű hisztidin-kináz receptor képes érzékelni a hidrogén-peroxidot, ami a jelet továbbítja a MAPK kaszkád felé, melyen keresztül aktiválódnak az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó transzkripciós faktorok (Singh, 2000). *Arabidopsis*ban, a patogén fertőzés során termelődő ROS elsősorban az MPK3, MPK4 és MPK6 kinázokat aktiválja (Siddhi és Sinha, 2015). Több ROS aktivált MAPK kaszkádot azonosítottak *Arabidopsis* modellben, melyek közül a MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 a patogén (Asai és mtsai., 2002), míg a MEKK1-MKK2-MPK4/6 az abiotikus és biotikus (Teige és mtsai., 2004; Furuya és mtsai., 2014) stresszválaszban játszik szerepet. Ugyanakkor nem csak a ROS van hatással a MAP kináz kaszkádra, hanem megfigyelhető egy feedback

mechanizmus közöttük, azaz a MAPK kaszkád képes negatívan és pozitívan is befolyásolni a ROS termelődést (Siddhi és Sinha, 2015).

2. Táblázat. Környezeti hatások, melyek hatással vannak az antioxidánsok és antioxidáns enzimek működésére (Shinozaki és mtsai., 2015 alapján).

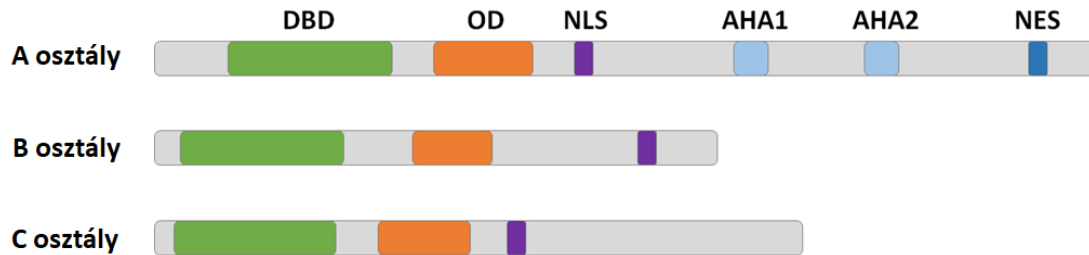
Antioxidáns vagy enzim	Kiváltó stressz
E vitamin	Szárazság
Aszkorbát-peroxidáz	Szárazság, magas CO ₂ , magas fényerősség, ózon, Paraquat, só
Kataláz	Hideg
Glutation	Hideg, szárazság, γ-sugárzás, hőstressz, magas CO ₂ , ózon, SO ₂
Glutation-reduktáz	Hideg, szárazság, magas CO ₂ , ózon, Paraquat, só
Poliaminok	Szárazság, meleg, ózon, K-, P-, Ca-, Mg-, Fe, Mn-, S- és B hiány
Szuperoxid-dizmutáz	Hideg, magas CO ₂ , erős fény, megnövekedett O ₂ , ózon, Paraquat, só, SO ₂

A növényi hormonok, mint az auxin, abszcizinsav, szalicilsav és brasszinoszteroidok, a NADPH oxidázok aktiválásán keresztül képesek a H₂O₂ termelést befolyásolni, ezáltal szerepet játszanak a ROS-jelátvitelben (Bartoli és mtsai., 2013; Consideine és Foyer, 2014). A ROS és a hormonok közti kapcsolat, illetve az általuk aktivált Ca²⁺ és MAPK kaszkádnak köszönhetően a ROS-jelátvitel nem csak az abiotikus és biotikus stresszválaszban, de a növények növekedésében és fejlődésében is szerepet játszik (Mittler és mtsai., 2011; Consideine és Foyer, 2014).

1.6. Hősokk transzkripciós faktorok

A hősokk faktorok (HSF) széles körben elterjedtek a növényvilágban, hiszen míg más élőlényben egy vagy csak néhány gén kódol hősokk faktort, addig a növények sokkal nagyobb géncsaláddal rendelkeznek: *Arabidopsis*ban 21 (Nover és mtsai., 2001), rizsben 25 (Chauhan és mtsai., 2011), míg repcében 64 (Zhu és mtsai., 2017) HSF gén található. A növényekben, a hősokk faktorok fontos szerepet töltenek be a hőstressz kivédésében, aktiválva a hősokk proteinek (HSP), azonban újabb kutatások szerint más károsító hatások elleni védekezésben is részt vesznek (Shinozaki és mtsai., 2015). *Arabidopsis*ban, szerkezetük alapján 3 osztályt (A, B és C; 1. Ábra) és ezen belül 14 csoportot különítünk el. A HSF-ok rendelkeznek egy konzervált DNS-kötő és oligomerizációs régióval, illetve egy szintén konzervált sejtmagi

lokalizációs szignállal (NLS). Az A osztályban megfigyelhető még egy vagy több aromás, hidrofóbikus és savas aminosavakban gazdag aktivátor motívum (AHA) és egy sejtmagi export szignál is (NES) (1. ábra; Nover és mtsai., 2001).



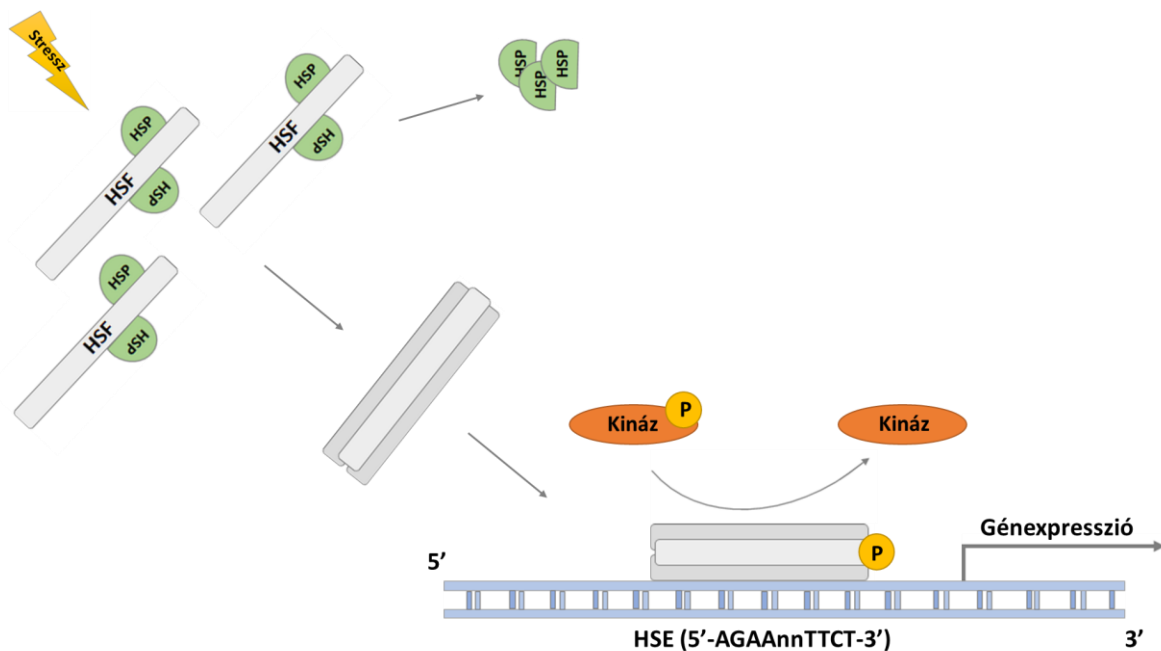
1. Ábra. Az *Arabidopsis* hőszokk faktorok osztályozása szerkezetük alapján (Nover és mtsai., 2001; Pérez-Salamó, 2014 doktori dolgozata alapján). DBD – DNS kötő régió, OD – oligomerizációs régió, NLS – nukleáris lokalizációs szignál, AHA1, AHA2 – aktivátor motívum, NES – nukleáris export szignál.

A legtöbb HSF az A osztályba tartozik, melyek az AHA motívumoknak köszönhetően transzkripciós aktivitással rendelkeznek (Nover és mtsai., 2001; Miller és Mittler, 2006). Az aktivátor motívum jelenléte ellenére, megfigyeltek transzkripciós gátlással rendelkező A-típusú hőszokk faktort is, mint a HSFA5 (von Koskull-Döring és mtsai., 2007), ami a HSFA4-típusú hőszokk faktorokkal heterooligomert képez, és gátló hatással van azok működésére (Baniwal és mtsai., 2007). A B osztály tagjaiban nincs jelen AHA régió, azonban megfigyelhető egy konzervált LFGV gátló motívum, ezért valószínűleg transzkripciós represszorként működnek (Czarnecka-Verner és mtsai., 2004). A C osztályban eddig csak egy hőszokk faktort azonosítottak, azonban annak funkciójáról nem túl sok információ áll rendelkezésre (Soares-Cavalcanti és mtsai., 2012).

Stressz hiányában, a HSF-ok a citoszolban helyezkednek el, ahol komplexeket alkotnak a hőszokk proteinekkel (például a HSP90-el). Stressz hatására ezek a komplexek szétesnek, majd a hőszokk faktorok trimert képezve a sejtmagba kerülnek. Itt, felismerik a célgének promoterében található hőszokk elemeket (HSE), melyet egy palindrom transzkripciós faktor (TF) kötő régió (5'-AGAAnnTTCT-3') alkot, és ezekhez kapcsolódva aktiválják a génexpressziót, ezáltal a stresszválaszt (Akerfelt és mtsai., 2010; Anckar és Sistonen, 2011). A 2. Ábra a hőszokk faktorok feltételezett, stressz általi aktiválódását és a hőszokk elemek kötését mutatja be.

A növényi hőszokk faktorok nemcsak a magas hőmérsékletre adott választ, hanem más környezeti hatás által kiváltott reakciót, illetve a növények fejlődését is képesek szabályozni (Scharf és mtsai., 2012; Albihlal és mtsai., 2018). Genomszintű vizsgálatok kimutatták, hogy

egyes növényi HSF-ok nem csak a hőszokk proteinek és a chaperonok, hanem olyan gének expresszióját is képesek szabályozni, amelyek szerepet játszanak a transzkripcióban, fehérje bioszintézisben, metabolizmusban, fejlődésben és a jelátvitelben (Busch és mtsai., 2005). Az utóbbi években körülbelül ezer HSFA1b célgént azonosítottak *Arabidopsis*-ban, illetve kimutattak egy olyan 27 db, HSFA1b-által szabályozott, transzkripciós faktorból álló hierarchikus jelátviteli hálózatot, amely 1780 további gén aktivitását irányítja (Albihlal és mtsai., 2018).



2. Ábra. A növényi hőszokk faktorok feltételezett aktivációja és működése (Shinozaki és mtsai., 2015 alapján). HSF – hőszokk faktor, HSP – hőszokk protein, P – foszfát, HSE – hőszokk elem.

A ROS-indukált *Arabidopsis* HSFA4A transzkripciós faktor számos, a stresszválaszban szerepet játszó gén expresszióját elősegíti, amelyek között ZnF, MYB és WRKY-típusú transzkripciós faktorok is megtalálhatók (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). A HSFA4A kedvező hatását különböző stressz során nemcsak *Arabidopsis*-ban, hanem más fajokban is leírták. Kimutatták, hogy a *HSFA4A* túltermelése rizs növényekben kadmium toleranciát (Shim és mtsai., 2009), míg napraforgóban (Carranco és mtsai., 2017) és repcében (Lang és mtsai., 2017) szárazságtűrést eredményez. Repce növényekben, a *BnHSFA4A* génexpressziója fokozódik szárazság és hőstressz hatására, mely alátámasztja azt az feltevést, miszerint ez a transzkripciós faktor részt vehet több, együttesen ható stressz kivédésében is (Zhu és mtsai., 2017).

A hőszokk faktorok több olyan poszt-transzlációs módosításokon mehetnek keresztül, mint foszforiláció, acetiláció vagy szumoiláció, melyek befolyásolják azok aktivitását és stabilitását (Akerfelt és mtsai., 2010). Kimutatták, hogy a humán HSF1 transzkripció faktor MAP-kináz típusú ERK1 (extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1) és GSK3 (glikogén szintáz kináz 3) általi foszforilációja gátolja a faktor működését és a hőszokk választ normál körülmények között (Chu és mtsai., 1996). A gátló hatású foszforiláció elősegíti a HSP90-es fehérjékkel való kölcsönhatást, ugyanakkor elengedhetetlen a szumoilációhoz is, mely együttesen gátolja a HSF1-függő gének aktivitását (Hietakangas és mtsai., 2003; Wang és mtsai., 2006). Ellentétben az ERK1 vagy GSK3 hatásával, a CaMKII (kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II) vagy PLK1 (polo-típusú kináz 1) kinázok hiperfoszforilációja stimuláló hatással van a HSF1-re, növelve annak sejtmagi transzlokációját és transzkripció aktivitását (Holmberg és mtsai., 2001; Kim és mtsai., 2005). Az élesztő HSF1 is hiperfoszforilálódik hőstressz hatására, mely az aktiválódás előfeltétele, illetve nélkülözhetetlen a célgén promoterében található HSE-k felismerésében (Hashikawa és Sakurai, 2004). Növényekben, a változatos és nagy HSF és protein kináz géncsaládoknak köszönhetően, a hőszokk faktorok foszforilációja sokkal összetettebb. Akárcsak az állati rendszerekben, úgy a növényekben is megfigyelhető a HSF foszforiláció negatív vagy pozitív hatása. *Arabidopsis*-ban, a ciklin-függő CDC2 kináz foszforilálja a HSF1 faktort, ami megakadályozza annak DNS-hez való kötődését (Reindl és mtsai., 1997). Paradicsomban, egy kalcium-függő, hő aktivált MAP-kináz foszforilálja a HSF3 faktort ami serkenti annak aktivitását (Link és mtsai., 2002). *Arabidopsis*-ban a kalmodulin-kötő protein kináz 3 (CBK3) kölcsönhat és foszforilálja a HSFA1-et, elősegítve a hőszokk elemek kötését és a HSP gének transzkripció aktivitását (Liu és mtsai., 2008). Kimutatták azt is, hogy a hőstressz aktiválja az *Arabidopsis* MAP-kináz 6-ot (MPK6), mely komplexet képez a HSF2 faktoral és foszforilálja azt (Evrard és mtsai., 2013). Az *Arabidopsis* HSFA4A transzkripció faktor szusztrátja az MPK3 és az MPK6 MAP kinázoknak, azonban a MAP kinázok általi foszforiláció biológiai vagy molekuláris funkciója nem tisztázott teljesen (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

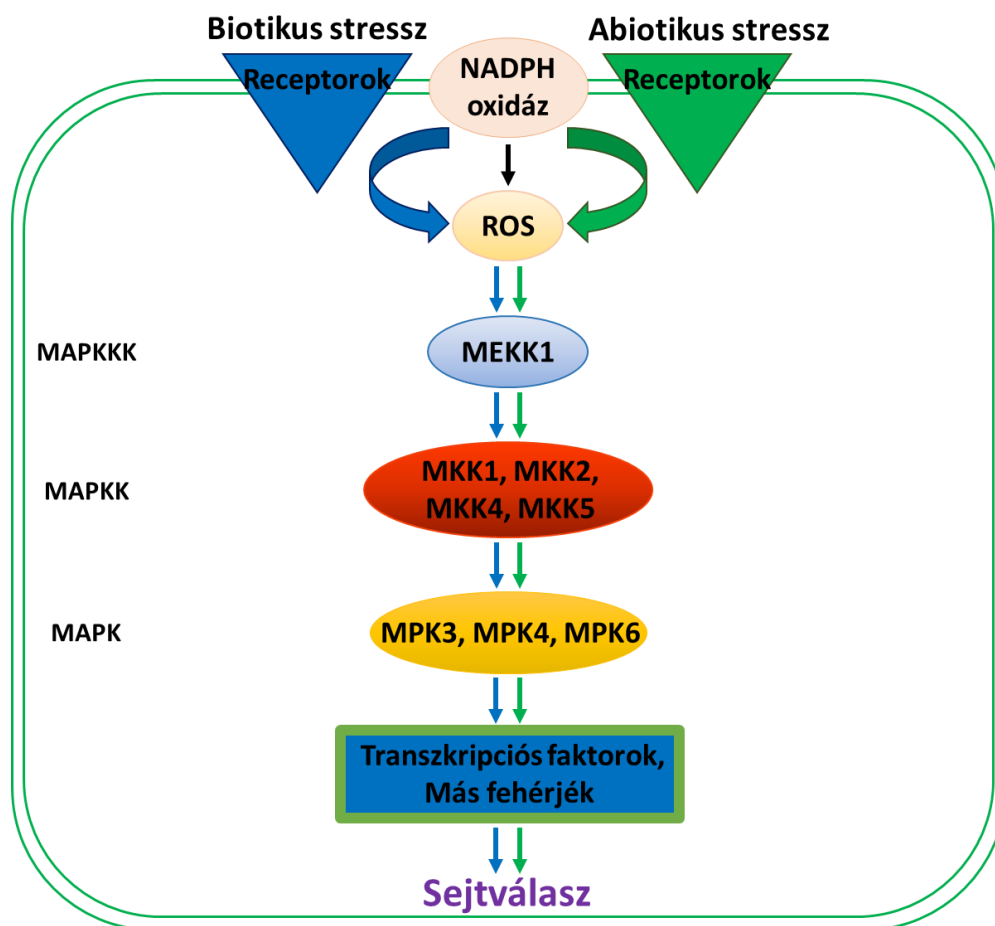
1.7. Mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK)

A növények növekedéséhez és fejlődéséhez elengedhetetlen a megfelelő és jól koordinált kommunikáció a sejtek, a szövetek és a szervek között. Eukariótákban a környezet-sejt, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatok különböző receptorokon keresztül valósulnak meg. Ezek közé tartoznak a receptor-szerű protein kinázok (RLK), melyek az érzékelt jelet a mitogén-aktivált

protein kináz (MAPK) kaszkád irányába továbbítják (Xu és Zhang, 2015). A MAPK kaszkádok konzervált jelátviteli modulok az eukarióta szervezetekben, melyek három fő kináz típusból állnak: MAPK kináz kináz (MAP3K), MAPK kináz (MAP2K) és MAP kináz (MAPK, MPK), melyek működése egymás hullámszerű foszforilációján alapszik (Colcombet és Hirt, 2008; Opendakker és mtsai., 2012). A MAP3K szerin/treonin kinázok foszforilálják a tirozin- és szerin/treonin-típusú MAPK kinázokat, ezek pedig aktiválják a szerin/treonin-típusú MAP kinázokat, melyek változatos célpontokat foszforilálhatnak, mint például transzkripciós faktorokat, splicing faktorokat, más kinázokat és egyéb szabályozó fehérjéket (Mishra és mtsai., 2006). Az *Arabidopsis thaliana* genomjában 60-80 gén kódol MAP3K, 10 gén MAP2K és 20 gén MAPK típusú kinázokat. Más növényeken végzett kutatások hasonló MAPK kaszkádba tartozó kináz eloszlást találtak (Hamel és mtsai., 2006). A MAP3K a legnagyobb és a legváltozatosabb csoport a MAPK kaszkádból, és két alcsoportba sorolható: a MEKK-típusú (pl.: ANP1/2/3 és MEKK1 kinázok) és a RAF-szerű kinázokra (pl.: CTR1 és EDR1 kinázok). A MEKK alcsoportnak tulajdonítható a MAPKKK funkció, azonban a RAF-szerű kinázok ilyen fajta működése még nem tisztázott. A MAP2K csoport rendelkezik a legkevesebb taggal, azonban több MAP kinázot képes aktiválni, ami arra utal, hogy több jelátviteli útvonal is ezen a ponton ágazhat el. A csoporton belül négy alcsoportot (A-D) azonosítottak, amelyek közül, a D alcsoport kivételével, a legtöbb részt vesz valamilyen formában az abiotikus stressz, a patogén és hormonális válasz kialakításában, illetve a sejtosztódás szabályozásában. A MAP kinázoknak két típusa ismert: a TEY és TDY aminosav motívumokat tartalmazó kinázok. A TEY-n belül három csoport különíthető el, az A, B és C, melyek közül az A csoport tagjai, mint az MPK3 és MPK6, a környezeti stressz- és hormonális válaszban játszanak szerepet, míg a B csoport tagjai, mint az MPK4, a környezeti stresszválaszban és a sejtosztódásban vesznek részt. A C csoport kevésbé ismert, de a cirkadián ritmussal hozható összefüggésbe. A TDY-típusú kinázok alkotják a D csoportot, melyek szerkezetben eltérnek a másik három csoporttól, és valószínűleg a gombafertőzések és a sebzés indukálja a működésüket (Ichimura és mtsai., 2002; Colcombet és Hirt, 2008; Opendakker és mtsai., 2012). A MAPK foszforilációs kaszkádon alapuló jelátvitel fontos a sejtválaszban, de ugyanennyire fontos a jel által létrehozott válasz csillapítása is. A MAP kinázok negatív szabályozói a tirozin foszfatázok (PTP), szerin/treonin foszfatázok (PSTP, például a PP2C család) és a kettős foszfatázok (DSP), mint az MPK-specifikus foszfatázok (MKP), melyek defoszforiláció segítségével fejtik ki hatásukat (Lumbreras és mtsai., 2010).

A MAP kinázok fontos szerepet töltenek be a biotikus és abiotikus stresszválasz kialakításában és a ROS jelátvitelben. A 3. Ábrán egy ROS-indukált, MAPK kaszkádon

keresztüli sejtválasz sematikus jelátviteli útja látható (Siddhi és Sinha, 2015). *Arabidopsis*ban az egyik legfontosabb MAP kináz kaszkád modul a bakteriális- és gombafertőzéskor aktiválódó MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 kaszkád, ami az FLS2 flagellin receptortól érkező jelen keresztül aktiválja a WRKY22 és WRKY29 transzkripciós faktorokat (Asai és mtsai., 2002). Egy másik fontos MAPK modul a MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 kaszkád, ami a patogénhatás mellett, abiotikus stressz (pl.: só, hideg, szárazság és sebzés) során is aktiválódik (Nakagami és mtsai., 2005). Az *Arabidopsis* MAP kinázok közül az MPK3, MPK4 és MPK6 kinázokat ismerik legjobban. Ezeket a MAP kinázokat elsősorban a különböző környezeti stresszhatások aktiválják (Colcombet és Hirt, 2008).



3. Ábra. A MAP kináz kaszkád ROS-indukált működése (Siddhi és Sinha, 2015 alapján). NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid foszfát.

Az MPK3 és MPK6 kinázok szerepe kulcsfontosságú a sejt szintű stresszválaszban, hiszen a patogén rezisztencia és az abiotikus stressztolerancia kialakítása mellett képesek szabályozni az oxidatív, az etilén és az ABA jelátviteli utakat is (Li és mtsai., 2012a; Rasmussen és mtsai., 2012; Su és mtsai., 2017; Bigeard és Hirt, 2018; Sun és mtsai., 2018). Foszforylációs aktivitásuk

révén képesek befolyásolni a jelátvitelben résztvevő transzkripciós faktorok aktivitását. Ilyen TF-ok lehetnek a patogén válaszban részt vevő WRKY33 és ERF6 (Mao és mtsai., 2011; Meng és mtsai., 2013), az oxidatív stresszválaszt szabályozó ZAT10 (Nguyen és mtsai., 2012b), az ABA jelátvitelben szerepet játszó MYB44 (Nguyen és mtsai., 2012a), vagy az ICE1, ami a hidegtolerancia kialakításában vesz részt (Li és mtsai., 2017). Az MPK3 és MPK6 kinázok szerepet játszanak a hősokk faktorok foszforilációjában is (Pérez-Salamó és mtsai., 2014; Pitzschke, 2015).

2. Célkitűzés

Munkám célja, hogy a csoportunkban azonosított HSFA4A transzkripciós faktor jellemzését folytassam, ezáltal jobban meg tudjuk érteni a faktor stresszválaszban betöltött szerepét.

- Génexpresszió változásának tanulmányozása *Arabidopsis* növényekben különböző stressz körülmények között.
- Saját promoteres, YFP-hez kapcsolt HSFA4A génkonstrukció expressziója transzgenikus *Arabidopsis* növényekben.
 - A génkonstrukció segítségével a fehérje szint változásának vizsgálata többféle stressznek kitett növényekben.
 - A HSFA4A-YFP fúziós fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata.
 - A HSFA4A-YFP alkalmazásával a HSFA4A fehérje promoter kötésének vizsgálata ChIP technika segítségével.
- A HSFA4A MPK4 kináz általi foszforilációjának felderítése, *in vivo* és *in vitro* foszforilációs helyek azonosítása.
- Foszforilációt imitáló és kizáró mutáns HSFA4A elkészítése.
 - A foszforiláció multimerizációban betöltött szerepének vizsgálata BiFC technikával.
 - A vad típusú és mutáns HSFA4A túltermelésének hatása a túlélésre és oxidatív károsodásra só-, hő- és kombinált stresszben.
- Pontosabb modell kidolgozása a HSFA4A stressz jelátvitelben betöltött szerepéről.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Növényi anyagok és növénynevelés

A munkánk során minden kísérlethez *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípusú növényeket használtunk, mint vad típusú (wt) vonalat. A módosított géneket és génkonstrukciókat is ebben az ökotípusban fejeztettük ki, így létrehozva a túltermelő pER8-HSFA4A-S309D és a pHSFA4A::HSFA4A-YFP génkonstrukciót hordozó transzgenikus növényeket. A kísérletek során ezek mellett még a Pérez-Salamó és mtsai. (2014) által leírt pER8-HSFA4A túltermelő növényt is használtunk. A kísérletekhez, a csíráztatás előtt minden esetben a magokon felületi sterilizálást végeztünk: 70% etanol 1 perc, majd 5% Domestos 15 perc és végül steril vízzel 5x átmostuk a magokat. A túlélés teszthez a csíranövényeket műanyag hálón (SEFAR, 07-20/13) neveltük, a könnyebb áthelyezés céljából. A növényeket minden esetben *in vitro* steril körülmények között neveltük ½ MS táptalajon (½ MS – Murashige és Skoog (Duchefa), 0,8% agar (Duchefa) és 0,5% szacharóz (Molar Chemicals Kft), Koncz és mtsai., 1994), 22°C hőmérsékleten, 8h fény/16h sötét fényciklussal, illetve 100 µE m⁻² sec⁻¹ fényintenzitást használtunk (normál vagy kontroll körülmények). Az ösztradiol indukálható pER8 promoter alkalmazása esetén a túltermelő, illetve a kontrollként használt Col-0 vad típusú növényeket stresszkezelés előtt 24 órával 5µM ösztradiol ((17β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, Sigma-Aldrich) és 0,01% Silwet keverékével permetezzük le, hogy az indukálható promotert a kezelése előtt indukáljuk. Ilyenkor a stresszkezelések során használt táptalajba is 5 µM ösztradiolt tettünk, ezáltal biztosítva a magas és állandó expressziós szintet.

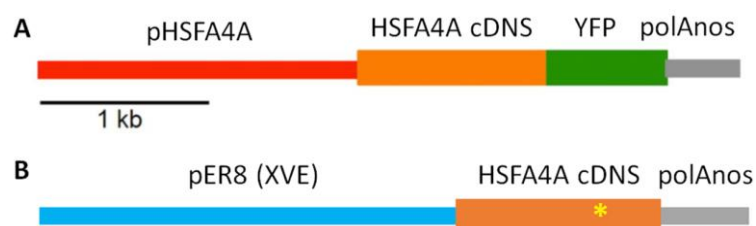
3.2. Stresszkezelések

A kísérletek során többféle stresszkörülményt (stresszkezelés) is alkalmaztunk, ahol minden esetben folyékony ½ MS táptalajt, 8h fény/16h sötét fényciklust és 100 µE m⁻² sec⁻¹ fényintenzitást használtunk. A stresszkörülmények a kísérletek során a következők voltak: (1) sóstressz, mely során a táptalajt 100 mM vagy 150 mM NaCl (Molar Chemicals Kft) sóval egészítettük ki (hőmérséklet 22°C) (2) hőstressz, mely során nappali hőmérsékletnek 37°C, míg éjjelnek 30°C használtunk, illetve (3) kombinált stressz, mely során a só- és hőstresszt egyszerre alkalmaztuk.

3.3. Génkonstrukciók létrehozása

A fehérje lokalizáció, illetve a DNS kölcsönhatás és transzkripció szabályozás vizsgálatához létrehoztuk a HSFA4A teljes hosszúságú cDNS C-terminális végén YFP-vel jelölt változatát, melynek kifejeződését a *HSFA4A* gén (*AT4G18880*) 2kb hosszú promoter szakasza szabályozta. A pHSFA4A::HSFA4A-YFP konstrukció (4A. Ábra) megalkotásához a pPCV-HSFA4A-YFP vektorból *BamHI-HindIII* emésztőhelyeket használva újra klónoztuk a *HSFA4A-YFP* génfüziós szakaszt a pENTRY-BS plazmidba (pENTRY-BS-pHSFA4A), mely tartalmazta a *HSFA4A* gén promoterét (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). A kapott fragmentumot, szekvenálás után, a pMDC99 bináris Gateway vektorba (Curtis és Grossniklaus, 2003) juttattuk Gateway LR Clonase reakcióval.

A HSFA4A foszforilációt imitáló mutáns változatának előállításához a Ser309 (szerin 309) aminosavat kicseréltük aszpartátra (Asp309). A HSFA4A cDNS *in vitro* mutagenéziséhez kétlépéses PCR (Polimeráz láncreakció) reakciót végeztünk, melyhez a templát a pET28-HSFA4A vektor volt, és a lépések hasonlóak voltak, mint a nem-foszforilálódó HSFA4A-S309A mutáns létrehozásánál (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). Első lépésben a HSFA4A-S309D és T7 primer párt használtuk a PCR reakcióhoz, majd a keletkezett mega primert a T7 primerrel kombinálva megcsináltuk a második PCR reakciót. Az így kapott PCR fragmentumot a pBluescript II SK+ plazmidba klónoztuk a *BamHI* és *HindIII* emésztőhelyekre, majd a kapott klónokat megszekvenáltuk. A hiba mentes és a mutációt tartalmazó HSFA4A-S309D cDNS-t (S309D – a szerin (S) 309 aminosav cseréje aszpartátra (D)) a pENTR2b Gateway vektorba ligáltuk a *BamHI* és *XhoI* emésztőhelyekre, majd Gateway LR clonase reakcióval létrehoztuk a pER8-HSFA4A-S309D ösztradiol indukálható túltermelő konstrukciót (4B. Ábra), a pER8GW (Papdi és mtsai., 2008) bináris vektort használva. A kész bináris vektorokat *Agrobaktérium* közvetített transzformációval juttattuk a vad típusú *Arabidopsis Col-0* növényekbe.



4. Ábra. A kísérletek során használt génkonstrukciók. **A)** A pHSFA4A::HSFA4A-YFP és **B)** a pER8-HSFA4A/HSFA4A-S309D génkonstrukciók sematikus térképe. A mutáció helyét a sárga csillag jelöli. pHSFA4A – *HSFA4A* gén promoter, HSFA4A cDNS – a *HSFA4A* gén komplementer DNS-e, YFP – sárga fluoreszkáló fehérje, polAnos – poli A vég és nopalín-szintáz terminátor, pER8 (XVE) – ösztradiol indukálható promoter.

A bimolekuláris fluoreszcens komplementációhoz (BiFC) szükséges génkonstrukciók előállításához PCR reakcióval, a HSFA4A-HindIII és HSFA4A-SmaI-NoStop primereket használva, felszaporítottuk a HSFA4A-S309A és HSFA4A-S309D fragmentumokat, melyhez a templátok a pENTR2b-HSFA4A-S309A (Pérez-Salamó és mtsai., 2014) és az újonnan létrehozott pENTR2b-HSFA4A-S309D vektorok voltak. A kapott terméket a pBluescript II SK+ plazmid *HindIII-SmaI* emésztőhelyekre klónoztuk, majd ellenőrzésképpen szekvenáltuk őket. Az ellenőrzött fragmentumokat átvittük a *HindIII* és *SmaI* helyeket használva a pSAT1A-nEYFP-N1 (p35S-nYFP) és pSAT1A-cEYFP-N1 (p35S-cYFP) BiFC vektorokba (<http://www.bio.purdue.edu/people/faculty/gelvin/nsf/index.htm>, 5. Ábra). A sikeres fúziót az osztott YFP-vel (N és C terminális végek) szekvenálással ellenőriztük. Az így kapott konstrukciókat, pSAT1A-HSFA4A-S309A-nEYFP-N1 (p35S-HSFA4A-S309A-nYFP) és pSAT1A-HSFA4A-S309A-cEYFP-N1 (p35S-HSFA4A-S309A-cYFP), pSAT1A-HSFA4A-S309D-nEYFP-N1 (p35S-HSFA4A-S309D-nYFP) és pSAT1A-HSFA4A-S309D-cEYFP-N1 (p35S-HSFA4A-S309D-cYFP), *Arabidopsis* sejt kultúrából készített protoplaszt transzformációra használtuk. Mindegyik konstrukció p35S konstitutív promoterral (karfiol mozaik vírus 35S promotor, CaMV35S) rendelkezett, mely a fúziós fehérje folyamatos kifejeződését biztosította.

A klónozáshoz a Gateway Cloning System-et (Invitrogene by Thermo Fischer Scientific) vagy a FastDigest emésztő enzimeket és T4 DNS ligázt (Thermo Scientific) használtuk a gyártó használati útmutatóját követve. A kétlépes PCR reakciókhoz Phusion High-Fidelity DNS polimerázt (Thermo Scientific) használtunk. A munkám során használt oligonukleotidok listája a Függelék F1. Táblázatában szerepelnek.

3.4. *Arabidopsis* növények transzformálása és szelekciója

A bináris vektorok T-DNS-ébe épített különböző génkonstrukciókat *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformációval juttattuk be az *Arabidopsis* Col-0 növényekbe. A 4-6 hetes virágzó *Arabidopsis* növényeket 5% szacharóz, 0.01% Silwet L77 tartalmú *Agrobacterium* oldatba merítettük, majd egy éjszakán át lefedve tároltuk (Clough és Bent, 1998). Ezt a lépést 7-10 nap múlva megismételtük az újonnan megjelenő virágokkal, a transzformáció hatékonyságának növelése céljából. Elvirágzás után az érett magokat begyűjtöttük, majd antibiotikus szelekcióval kiválogattuk a transzformáns vonalakat. A felület sterilizált magokat ½ MS táptalajon az alábbi antibiotikumok jelenlétében csíráztattuk:

Hygromicin 15-20 mg/l, Claforan-Karbenicillin 200-200 mg/l. Az antibiotikum rezisztens növények megjelenéséig normál körülményekre helyeztük a Petri csészéket, majd az üvegházba való kiültetést követően, az érett magokat papírzacskóban fogtuk fel.

3.5. Túlélés teszt

A pER8-HSFA4A (HSFox-wt) és pER8-HSFA4A-S309D (HSFox-m) konstrukciókat expresszáló transzgenikus növények stressztűrését túlélés teszttel vizsgáltuk, mely során a csíranövényeket tíz napig normál körülmények között neveltük, majd 24, illetve 48 órás só (100 vagy 150 mM NaCl), hő (37°C/30°C nappal/éjjel), illetve kombinált (sóstressz és hőstressz egyidejű alkalmazása) stressznek tettük ki őket. A meghatározott idejű stresszkezelés után a növényeket ismét normál körülményre helyeztük, majd tíz nap elteltével (regenerációs idő) kiszámoltuk a túlélő és halott (teljesen klorotikus, zöld levelek nélkül) növények százalékos arányát. A túlélő növényeket két kategóriába soroltuk: ép (erőteljes növekedés, új zöld levelekkel) és károsodott (lassan növő, kicsi növények és/vagy klorotikus levelekkel). A kísérletek során Col-0 növényeket használtunk kontrollnak.

3.6. Lipidperoxidáció

A lipidperoxidációt a malondialdehid (MDA) tartalom meghatározásával mértük, melyhez a TBARS (tiobarbitursav reaktív anyagok) tesztet használtuk (Hodges és mtsai., 1999). A mérésekhez tíz napig normál körülmények között nevelt növényeket két napig kontroll és stressz körülmények (100 és 150 mM NaCl, hőstressz: 37°C nappal/30°C éjjel, illetve ezek kombinációja) között növesztettünk, majd több párhuzamos mintát gyűjtöttünk, melyeket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottunk, és -80°C tároltunk felhasználásig. A növényi mintákat (100 mg) RETCH készülékkel tártuk fel egy csapágygolyó segítségével, majd 1 ml 0,1%-os TCA-val (triklórecetsav) homogenizáltuk, és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Inkubáció után, a mintákat 15 percig centrifugáltuk 13000 rpm-en, majd 200 µl üledékmentes felülúszót összekevertünk 800 µl 20%-os TCA és 0,5% TBA keverékével (TBA - tiobarbitursav), és 30 percig forraltuk. Ezután a mintákat jégen lehűtöttük, majd 5 perc centrifugálás (13000 rpm) után megmértük az elegyek abszorbanciáját 532 és 600 nm-en, Multiskan Go spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific) segítségével. Az MDA-TBA komplexek százalékos mennyiségét a következő képlettel számoltuk ki: $X(\%) = 100 \times (A_{532} - A_{600})$ (Zsigmond és mtsai., 2012).

3.7. Intracelluláris lokalizáció

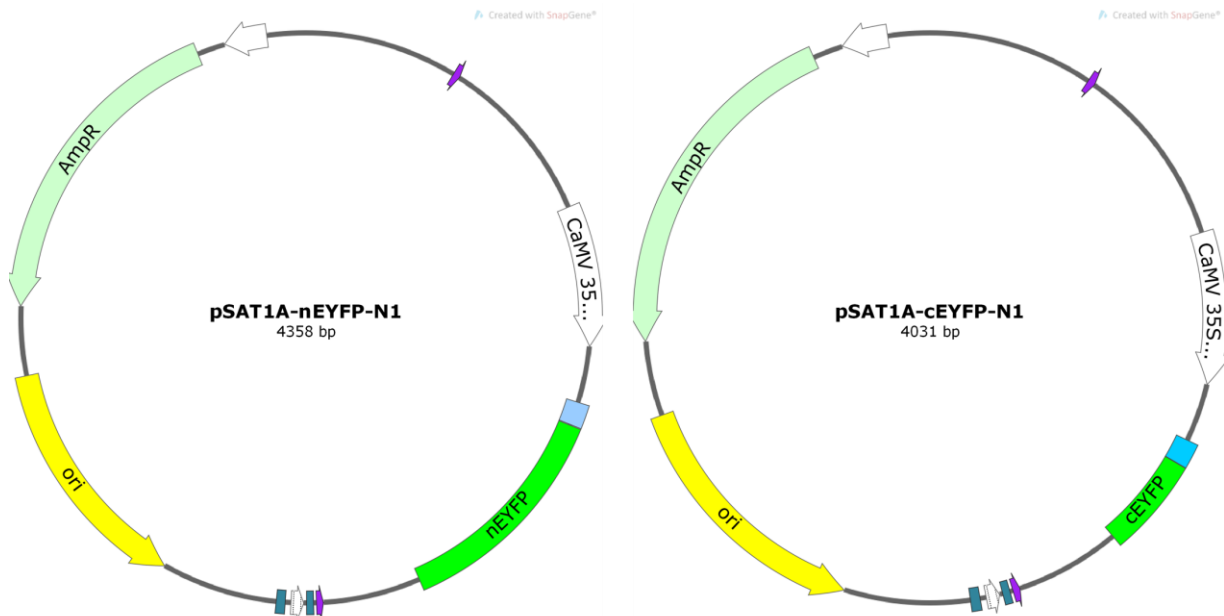
A HSFA4A-YFP fúziós fehérje intracelluláris lokalizációjának meghatározásához öt napos pHSFA4A::HSFA4A-YFP transzgenikus csíranövényeket használtunk, melyeket Olympus FV1000 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal vizsgáltunk. A csíranövényeket tárgylemezre helyeztük, melyen egy vékony réteg (megközelítőleg 1-2 mm) ½ MS táptalaj (kontroll) volt, amit sóstressz esetén 100 mM NaCl-al egészítettük ki. A kiszáradás elkerülése végett felhasználásig a tárgylemezt nedves környezetben tartottuk. A YFP jel nyomon követéséhez a csíranövények gyökerét vizsgáltuk, az intracelluláris változás észleléséhez pedig öt percnként fotót készítettünk ugyanarról a gyökérszejtről 30 percen keresztül. A fluoreszcencia intenzitásának változását a citoplazmában és a sejtmagban ImageJ2 szoftverrel analizáltuk (<https://imagej.net/ImageJ2>). A gyökérszőrök sejtmagjainak láthatóvá tételéhez azokat vízben oldott, 5 µg/ml végkoncentrációjú propidium-jodiddal festettük 20 percig. Kontroll növénynek minden esetben Col-0 használtunk.

3.8. Bimolekuláris fluoreszcens komplementáció (BiFC) és fehérje detektálás

A BiFC próbát Pérez-Salamó és mtsai. (2014) alapján kivitelezttük. A protoplasztokat *Arabidopsis* sejt kultúrából állítottuk elő, majd PEG (polietilén-glikol, Duchefa) transzformálással juttattuk be a konstrukciókat a protoplasztokba (Mathur és mtsai., 1995). A protoplasztokat 20 µg (10-10 µg) p35S-HSFA4A-n/cYFP (HSFA4A-wt, Pérez-Slamó és mtsai., 2014), p35S-HSFA4A-S309A-n/cYFP (HSF-S309A) vagy p35S-HSFA4A-S309D-n/cYFP (HSF-S309D) génkonstrukciókkal transzformáltuk. Negatív kontrollnak PEG kezelt, p35S-n/cYFP vagy p35S-HSFA4A-cYFP/p35S-nYFP konstrukciókkal transzformált protoplasztokat használtunk. Huszonnégy óra 22°C-os inkubáció után a fluoreszcenciát Olympus FV1000 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal vizsgáltuk, majd a YFP jelerősséget ImageJ2 (<https://imagej.net/ImageJ2>) szoftverrel elemeztük. A fúziós fehérje jelenlétének vizsgálatára Western blot analízist végeztünk a transzformált protoplasztokból származó fehérjekivonatokon. Ehhez összegyűjtöttük a protoplasztokat, majd 1xSDS pufferrel (SDS – nátrium-dodecyl-szulfát, 5xSDS puffer: 10% SDS, 20% béta-merkaptotanol, 50% glicerin, 0,315 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,03-0,05% brómfenolkék) felforraltunk, hogy feltárjuk a sejteket. A fehérjéket 8%-os (w/v) SDS-PAGE-el (PAGE – Poliakrilamid gélelektroforézis) méret

szerint elválasztottuk, majd Western blot próbát végeztünk anti-GFP egér monoklonális ellenanyaggal (Roche), amely a cYFP-jelölt fehérjéket ismeri fel.

Az 5. Ábra a BiFC kísérletekhez használt konstrukciók megalkotásához használt alapvektorokat mutatja be.



5. Ábra. A klónozáshoz használt BiFC vektorok. A módosított HSFA4A-t a multiklónozó hely *HindIII* és *SmaI* emésztőhelyeire klónoztuk. AmpR – ampicillin rezisztencia gén, CaMV 35S – karfiol mozaik vírus 35S promotere, nEYFP, cEYFP – az osztott EYFP N- és C-terminális végei, ori – replikációs origó, kék négyzet – multiklónozó hely.

3.9. Nem-denaturáló PAGE, SDS-PAGE és Western blot analízis

A nem-denaturáló poliakrilamid gélelektroforézishez tíz napos transzgenikus *Arabidopsis* (pHSFA4A::HSFA4A-YFP) és Col-0 növényekből (100 mg) fehérjét izoláltunk, a következő pufferrel: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100 és 1xProtease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, Merck). A minták teljes fehérje tartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg. Az így kapott fehérje mintákhoz (100 µg fehérje), melyeket a multimerizációs kísérletekhez használtunk, különböző végkoncentrációjú (0 és 25 mM) dithiothreitol (DTT) adtunk, majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A DTT kezelt fehérjéket 7%-os (w/v) poliakrilamid gélen méret szerint szétválasztottuk, majd elektroblottolással Immobilon-P (Merck Millipore) membránra vittük Western blot analízishez.

Az SDS-PAGE-hez az előbbieken leírt módon izoláltunk fehérjét, majd a feltárt fehérje mintákból 25µg-ot 1xSDS pufferrel forraltunk, 8%-os (w/v) poliakrilamid gélen méret szerint

elválasztottunk és elektroblottolással Immobilon-P membránra vittük. A Western blot analízishez a membránokat egy órán keresztül 1xTBST blokkoló pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 5% sovány tejpor) inkubáltuk. Ezután 1,5 órán keresztül egérben termeltetett anti-GFP (Roche, 1:2000 hígításban) ellenanyagot tartalmazó 1xTBST blokkoló pufferben inkubáltuk, majd 3 x 10 percig mostuk a membránokat 1xTBST pufferben. Másodlagos ellenanyagként peroxidáz kapcsolt anti-egér ellenanyagot (Pierce, 1:5000 hígításban) használtunk 1,5 órán át, majd ismét 3 x 10 perc mosás következett. A fehérje detektáláshoz Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) reagenst és Fusion FX5 kamera rendszert (Vilber Lourmat) használtunk.

3.10. Kromatin Immunprecipitáció (ChIP)

A HSFA4A fehérje promoter kötését három, olyan gén promoterén teszteltük, melyek hőszokk elemeket (HSE) tartalmaznak: *ZAT12* (*AT5G59820*), *HSP17.6A* (*AT5G12030*), és *WRKY30* (*AT5G24110*). A kromatint tíz napos kontroll és stresszkezelte (6h 150 mM NaCl, 6h 37°C és ezek kombinációja) pHSFA4A::HSFA4A-YFP génkonstrukciót expresszáló növényekből izoláltuk az ABCAM ChIP protokollt (<https://www.abcam.com/>), illetve Haring és mtsai. (2007) cikkét követve. A ChIP kísérletekhez az immunprecipitációt Dynabeads Protein G (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) gyöngyöz hozzáadott anti-GFP (Roche) ellenanyaggal végeztük, míg a kontroll kísérletek esetében nem adtunk a gyöngyökhöz anti-GFP ellenanyagot. A reverse cross-linket és a DNS tisztítást az ABCAM ChIP protokoll alapján végeztük. Az így kapott DNS fragmentumokon qPCR (kvantitatív polimeráz lánreakció) reakciót végeztünk, olyan primer párokkal, melyek a célgén HSE-t tartalmazó promoter régióját zárják közre. Referenciának az alfa-3 tubulin (*TUA3*, *AT5G19770*) gén olyan promoter szakaszát használtuk, amely nem tartalmaz hőszokk elemet. A qPCR reakciókból származó adatokat a *TUA3*-on végzett qPCR reakció adatokkal normalizáltuk. A HSFA4A transzkripció faktor promoter kötését a kontroll génhez viszonyított relatív dúsulásként fejeztük ki (Aleksza és mtsai., 2017).

3.11. RNS izolálás és kvantitatív PCR (qPCR) reakció

Az RNS kivonáshoz 100 mg *Arabidopsis* növényi anyagot, illetve Nucleospin Plant RNA Kit-et (Macherey-Nagel) használtunk. A mintákban maradt DNS-t TURBO DNA-free™ Kit-el (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) távolítottuk el. A cDNS átíráshoz 1 µg RNS-t és High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitet (Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific) használtunk. A qPCR-hez a mintákat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-el (Thermo Scientific) kevertük össze és ABI 7900 Fast Real Time System (Applied Biosystems) PCR berendezéssel analizáltuk, a következő programot alkalmazva: 95°C 10 min, 40 ciklus: 95°C 15 s és 60°C 1 min. Minden kit esetében a gyártó használati útmutatóját követtük. A *GAPDH2* (*AT1G13440*) referencia génnel normalizált adatokból a génexpressziót a $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ módszerrel számoltuk ki (Czechowski és mtsai., 2005), majd a relatív expressziót ábráztuk.

3.12. Fehérje foszforiláció *in vitro* tesztelése

A foszforilációs vizsgálatokhoz minden génkonstrukciót (His6-MPK3, MBP-HSFA4A, MBP, GST-MPK4) BL21DE3 Rosetta sejtekben (Novagen) expresszáztunk. A GST-MPK4 konstrukciót Dr. Dóczi Róbertől (Agrártudományi Kutatóközpont, Martonvásár, Magyarország) kaptuk. A fehérjék tisztításához affinitás kromatográfiát használtunk, követve a gyártó használati útmutatóját, illetve a GST-MPK4 esetében Dóczi és mtsai. (2007) által leírtakat. A fehérje mintákat egy éjszakán át dializáltuk, a következő pufferben: 50 mM NaCl, 10% glicerin, 2 mM β-merkaptóetanol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5. A tisztított fehérje mintákat SDS-PAGE segítségével ellenőriztük, majd *in vitro* foszforilációs próbát végeztünk Pérez-Salamó és mtsai. (2014) alapján. A foszforilációs reakcióhoz 1-2 µg fehérjét adtunk és a következő puffert használtuk: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 185 kBq [γ-³²P] ATP. A reakciót egy órán át szobahőmérsékleten (23-25°C) inkubáltuk. Ezután a mintákat 12% (w/v) SDS-PAGE megfuttattuk, majd a poliakrilamid gélt Coomassie Protein Staining Solution-al (Thermo Scientific) festettük. Az autoradiográfiát AGFA Medical X-ray Blue Filmmel (AGFA) végeztük.

3.13. Az MPK4 foszforilációs helyek *in vitro* azonosítása a HSFA4A fehérjén

A tömegspektrográfiához a foszforilációs próbát a fent leírtak alapján végeztük, azzal a kivétellel, hogy a radioaktív ATP-t nem-radioaktív 1 μ M ATP-vel (Thermo Scientific) helyettesítettük. A reakció után a mintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, majd Coomassie Protein Staining Solution-al (Thermo Scientific) megfestettük a poliakrilamid gélt. Az MBP-HSFA4A fúziós fehérje méretének megfelelő sávot kivágtuk a poliakrilamid gélből, majd tömegspektrográfias elemzésre küldtük (www.szbk.u-szeged.hu/services_proteomics_research.php).

A kivágott fehérje sávokon tripszinnel *in-gel* 6 órás emésztést végeztek 37°C-on a következő protokoll alapján: <https://msf.ucsf.edu/protocols.html>. Az emésztett mintákat két részre osztották majd az egyiket Fe(III)-IMAC foszfopeptid dúsítást végeztek Ficarro és mtsai. (2009) alapján, és mindkét mintát Orbitrap Elite (Thermo Scientific) tömegspektrofotométerrel analizálták. A dúsított mintákban lévő foszfopeptideket a Protein Prospector adatbázis segítségével azonosították, míg a nem-dúsított mintákat a relatív foszforiláció kiszámolására használták, a következő képlettel (Pinnacle programmal):

$$\text{FP jel \%} = \frac{\text{FP csúcs terület}}{\text{FP csúcs terület} + \text{nem - FP csúcs terület}} \times 100$$

Rövidítés: FP: Foszfopeptid

3.14. *In vivo* foszforilációs helyek meghatározása

A HSFA4A *in vivo* foszforilációs helyek azonosításához tíz napos, sókezelt (150 mM NaCl, 6h) és kontroll pHSFA4A::HSFA4A-YFP növényekből izoláltunk fehérjét. A kísérlethez 500 mg növényi anyagot gyűjtöttünk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és TissueLyzer 30Hz géppel homogenizáltuk. A teljes fehérje izolálásához a MACS® Technology, Miltenyi gyártó által biztosított Lizis puffert használtuk, amelyet a következőkkel egészítettünk ki: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1x Sigma Protease Inhibitor Cocktail, 3 mM pNPP, 1 μ M MG132. A fehérje extraktumokon (3 mg/IP) anti-GFP kapcsolt mágneses gyöngyök (50 nm, MACS® Technology, Miltenyi) segítségével immuntisztítást, oszlopon történő tripszin emésztést, majd tömegspektrometriás elemzést végeztünk (Horváth és mtsai., 2017).

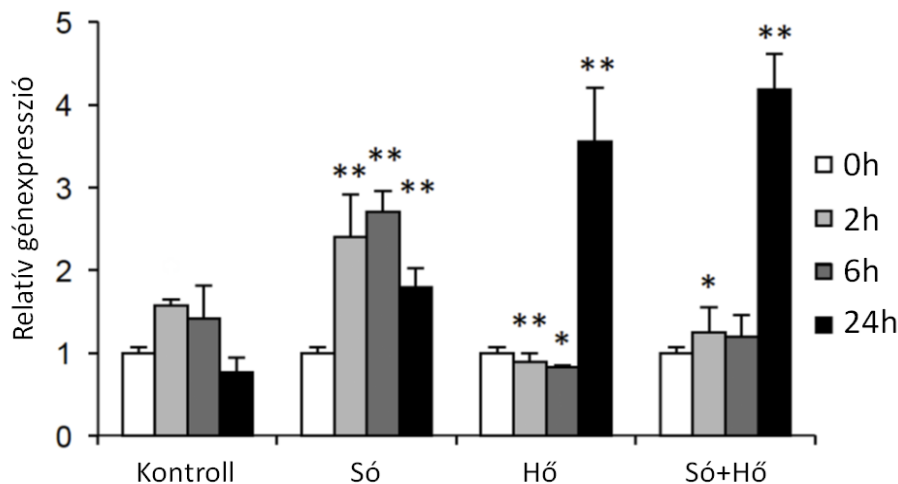
3.15. Adatelemzés és bioinformatikai módszerek

A kísérletek során használt fehérjeszekvenciákat a Phytozome adatbázisból (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) töltöttük le. A többszörös szekvencia illesztéshez EBI Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) szolgáltatást használtuk. A mikroszkópos képelemzéseket ImageJ2 programcsomaggal (<https://imagej.net/ImageJ2>) végeztük. A HSFA4A transzkripciófaktor által kötött promóter régiókat az AthaMap online felület (<http://www.athamap.de>) segítségével határoztuk meg. Az adatok statisztikai elemzését Microsoft® Excel® Version 14.7.7, míg a képfeldolgozást Adobe Photoshop CS5.1 programokkal végeztük.

4. Eredmények

4.1. A HSFA4A génexpresszió és fehérje szint változása stresszkörülményekben

A hőszokk faktorok széles körben elterjedtek a növényvilágban, és az évek során kiderült, hogy nem csak a magas hőmérséklethez, hanem más extrém körülményekhez való alkalmazkodásban is fontos szerepet töltenek be (Shinozaki és mtsai., 2015). Korábbi kísérletek már kimutatták, hogy a *HSFA4A* gént számos abiotikus (só, ozmotikus, oxidatív, hideg, meleg, nehézfém) és biotikus (bakteriális- és gombafertőzések) stressz indukálja (Pérez-Salamó és mtsai., 2014), azonban egyidejűleg ható kedvezőtlen körülményekben, azaz a kombinált stresszben ezt még nem vizsgálták. Ennek kiderítésére *Arabidopsis Col-0* növényeket só, hő és kombinált stresszrel kezeltünk, mely során különböző időpontokban mintát gyűjtöttünk, majd génexpressziós vizsgálatokat végeztünk (6. Ábra). A kontroll körülmények között nevelt növényekben a transzkripció az első hat órában kb. 1,5-szeresére emelkedett, majd 24 óra elteltével visszaesett a nulla időpont szintjére. A megfigyelt expressziós változás valószínűleg a kezelése során használt folyékony táptalajra történő áthelyezéssel járó fizikai hatásoknak tudható be, azonban ennek ellenére minden kezelés szignifikáns eltérést okozott a génexpresszió szintjén.



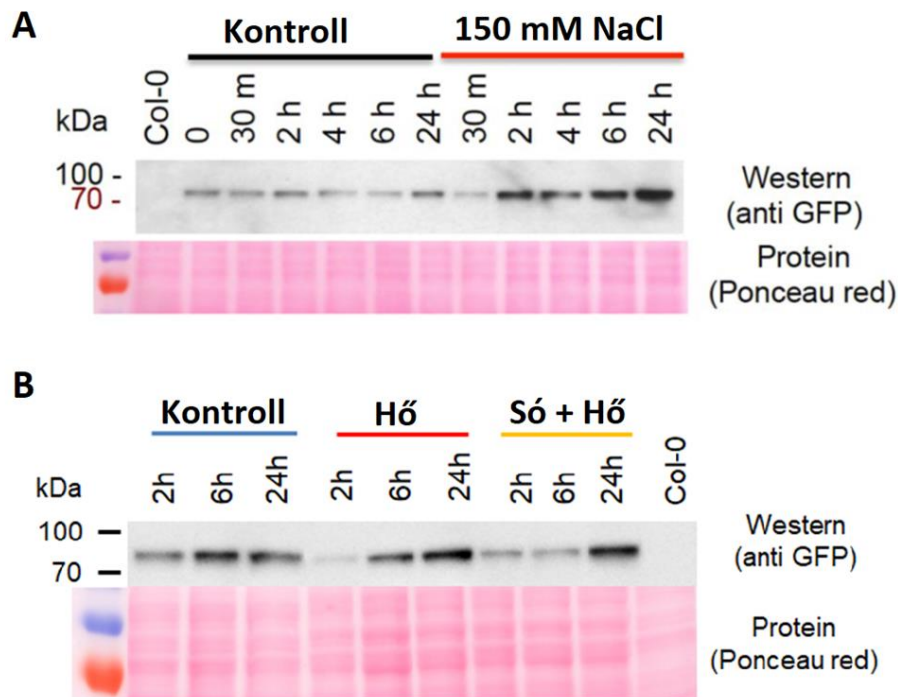
6. Ábra. Génexpressziós vizsgálatok. A *HSFA4A* gén expressziós mintázata *Arabidopsis Col-0* növényekben só- (150 mM NaCl, 0, 2, 6 és 24h), hő- (37°C nappal/30°C éjjel, 0, 2, 6 és 24h) és kombinált (só- és hőstressz kombinálása, 0, 2, 6 és 24h) stresszkezelés után. A nulla órához viszonyított relatív expressziót és a standard hibát ábrázoltuk, ahol a 0h = 1. A kontrollhoz viszonyított szignifikanciát *Student t-teszt*tel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. Kontroll – kontroll körülmény, Só – sóstressz, Hő – hőstressz, Só+Hő – kombinált stressz.

Sókezelés hatására 2,5-3-szoros növekedést figyeltünk meg, mely már két óra után megjelent és hat óra elteltével is jelen volt, míg a 24 órás mintában ez már csak kétszeres volt. A hőkezelés két és hat óra után nem volt hatással a génexpresszióra, azonban 24 óra elteltével több, mint háromszorosára emelte a transzkripciót. A kombinált stressznek, a hőstresszhez hasonlóan, az első hat órában szintén alig volt hatása, de az utolsó időpontban négyszeresére emelte a *HSFA4A* expressziós szintjét. Érdekes módon az általunk használt hő- és kombinált stressz csak egy hosszabb idő után fejtette ki hatását a *HSFA4A* génexpressziójára, ezzel szemben a sóstressz már a kezelés elején is (6. Ábra).

A génexpresszió mellett a fehérje szintben történő változások és annak összhangja a transzkripcióval egyaránt fontos a megfelelő stresszválaszhoz. Mivel nem állt rendelkezésre anti-HSFA4A ellenanyag, a kísérletek során egy YFP-vel jelölt génkonstrukció segítségével vizsgáltuk a fehérjeszint *in vivo* változását. Olyan bináris vektort hoztunk létre, mely tartalmazta a *HSFA4A* gén YFP-jelölt változatát, illetve az így keletkezett génfüziót a *HSFA4A* saját 2 kb hosszú promotere segítségével (pHSFA4A::HSFA4A-YFP) fejeztettük ki. A kapott génkonstrukciót vad típusú *Arabidopsis* növényekbe juttattuk, majd a transzgenikus növényeket használva, kétféleképpen próbáltuk vizsgálni a fehérje mennyiségi változását. Az első kísérleti rendszerben a növényeket több időpontban stresszkezeltek, mintát gyűjtöttünk, majd fehérjét izoláltunk és egyenlő mennyiségben poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottuk és Western blot analízist végeztünk. A második megközelítésben kontroll körülményben és kétórás sókezelés után vizsgáltuk a transzgenikus növények gyökerét konfokális mikroszkópia segítségével. A könnyebb megfigyelés érdekében az ötnapos csíranövényeket egy vékony réteg táptalajjal beborított tárgylemez segítségével vizsgáltuk.

A Western blot technika segítségével minden esetben sikerült kimutatni a HSFA4A-YFP fúziós fehérje jelenlétét a transzgenikus növényekben, míg a Col-0 növényekben ez természetesen nem volt jelen. A kísérletek során a transzkripciós vizsgálatokhoz hasonló eredményeket kaptunk. Kontroll körülmények között nem vagy csak egy nagyon enyhe változás volt megfigyelhető a fehérje szintben. A stresszkezeléseknek kitett növényekben a HSFA4A-YFP nagyobb mennyiségben volt jelen. A sókezelés, a génexpresszióhoz hasonlóan, már az első két óra után megemelte a fehérje szintet, ami magas maradt 24 órán keresztül. A hő és kombinált stressz esetében ez első hat órában nem figyeltünk meg változást, azonban 24 óra elteltével mindkét stresszkezelés megemelte a HSFA4A-YFP tartalmat (7. Ábra). A hő és kombinált stresszkezelés során kapott eredmények is összhangban állnak a génexpressziós vizsgálatok során kapott adatokkal.

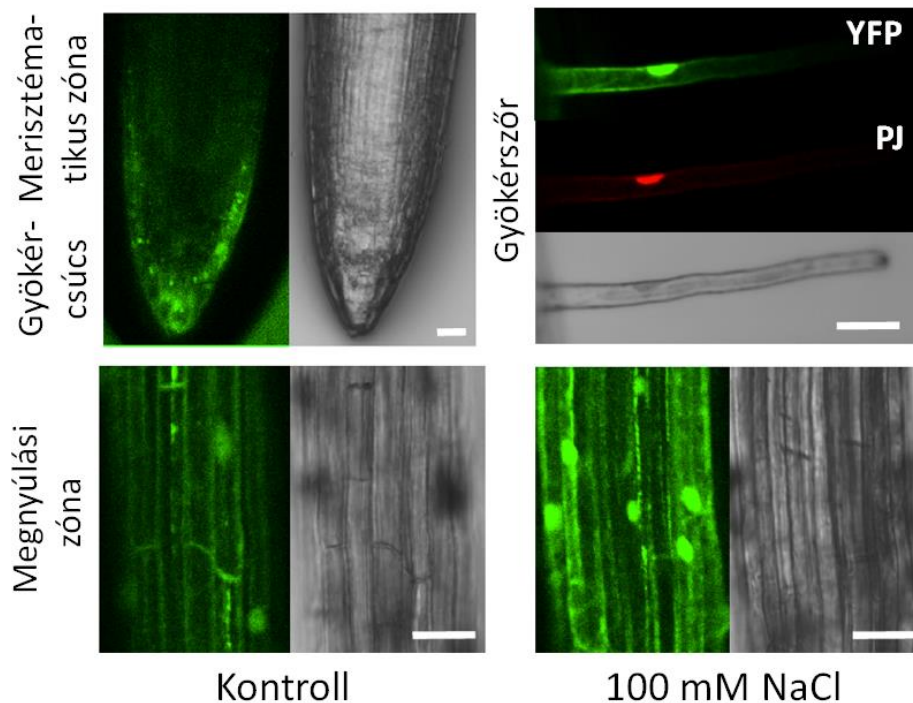
A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a HSFA4A transzlációja, és ennek megfelelően a fehérje szintje összhangban van a *HSFA4A* gén indukciójával.



7. Ábra. Western blot kísérletek. A HSFA4A-YFP fúziós fehérje detektálása 10 napos pHSFA4A::HSFA4A-YFP génkonstrukciót hordozó transzformáns növényekben **A**) kontroll és sóstressz (150 mM NaCl, 0-24h), illetve **B**) hőstressz (37°C nappal/30°C éjjel) és kombinált só- és hőstressz körülmények között. Mindegyik kezelés során megfigyelhető a HSFA4A-YFP erősödése. A fúziós fehérjét Western blot során anti-GFP ellenanyaggal mutattuk ki. Kontroll – kontroll körülmények, 150 mM NaCl – sóstressz körülmények, Hő – hőstressz, Só + Hő – kombinált stressz, Col-0 – *Arabidopsis* Col-0 minta, 0 – kezdeti, nulla időpontban szedett minta, 30m – 30 perc, 2h, 4h, 6h, 24h – 2, 4, 6, 24 óra után szedett minta.

Mikroszkópos vizsgálatok segítségével is kimutatható volt a HSFA4A-YFP fúziós fehérje a transzgenikus növényekben. Kontroll körülmények között a HSFA4A-YFP fúziós fehérje eloszlása leginkább a gyökércsúcs sejtjeiben, a megnyúlási és differenciációs zónában, illetve a gyökérszőrökben volt megfigyelhető. A YFP fluoreszcencia egyaránt jelen volt a sejtek citoplazmájában és sejtmagjában is. A sejtmagi lokalizáció kimutatására a gyökérszőröket propidium-jodiddal festettük, mely során a kapott fluoreszcencia jel megegyezett a HSFA4A-YFP fluoreszcencia jellel. Szerettük volna megtudni, hogy a sókezelés milyen hatással van a HSFA4A-YFP fluoreszcencia intenzitás változására, ezért két órás 100 mM NaCl kezelésnek vettettük alá a transzgenikus HSFA4A-YFP konstrukciót tartalmazó növényeket. A sókezelés hatására a fluoreszcencia megerősödött a gyökérsejtek sejtmagjában és citoplazmájában is, azonban ez hangsúlyosabb volt a sejtmagokban (8. Ábra). A sókezelés során tapasztalt

HSFA4A-YFP fúziós fehérje fluoreszcencia emelkedése összhangban volt a Western blot kísérletek során tapasztalt emelkedéssel. Az eredmények alapján elmondható, hogy néhány órás sóstressz megemelte a HSFA4A-YFP fehérje mennyiségét a kontroll körülményekhez képest, és ez a változás kimutatható volt Western blot és konfokális mikroszkópia technika segítségével is (7. Ábra, 8. Ábra).

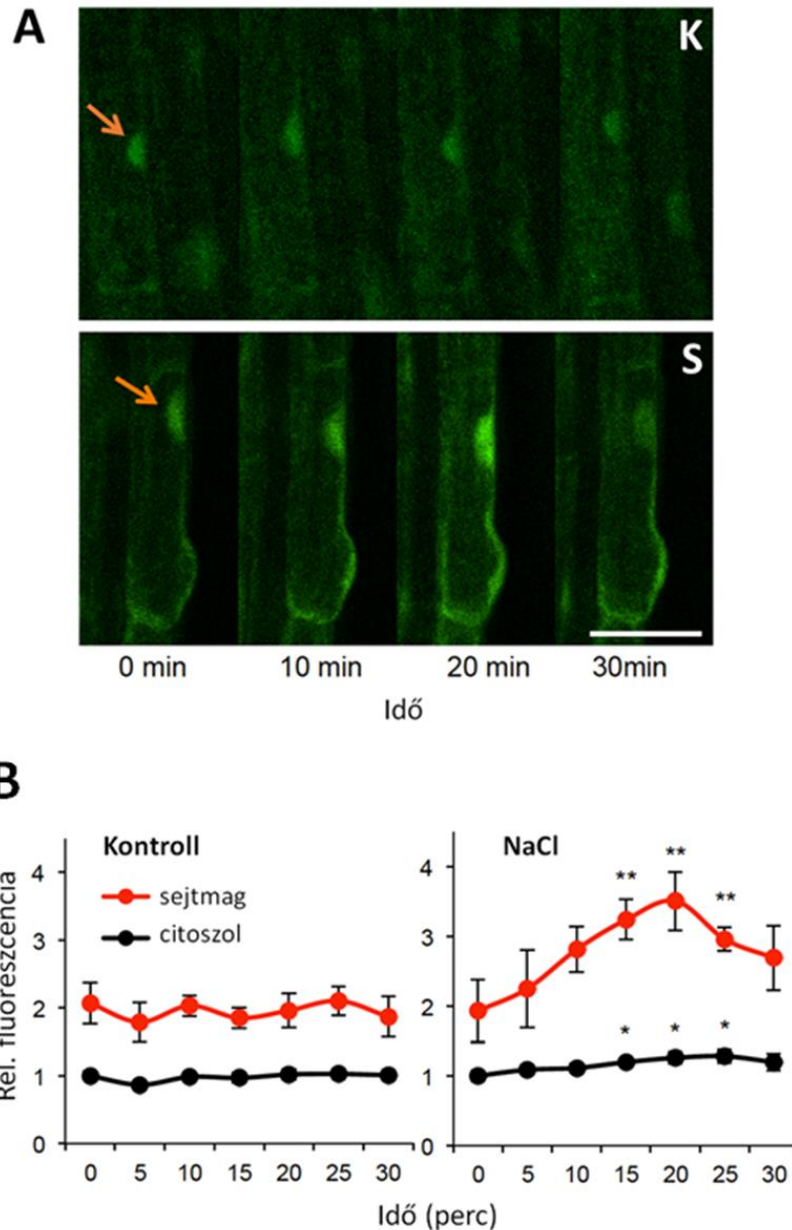


8. Ábra. A HSFA4A-YFP fúziós fehérje detektálása konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal gyökérben. A HSFA4A sejtmagi lokalizációjának bemutatására a gyökércsúrt propidium-jodiddal (PJ) festettük. A megnyúlási zóna kontroll és só (100 mM NaCl, 2h) kezelés mellett látható, két óra sókezelés után a YFP-jel megerősödik. Méretskála: 20 μ m. Kontroll – kontroll körülmény, 100 mM NaCl – sókezelés.

4.2. A HSFA4A transzkripciós faktor sejtmagi felhalmozódása

Az eddig végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy a HSFA4A-YFP fúziós fehérje, stressz és stresszmentes környezetben egyaránt megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban is. Néhány órás sóstressz hatására megemelkedik a HSFA4A-YFP fúziós fehérje szint, mely a sejtmagban hangsúlyosabb. Ismert, hogy a hőszokk faktorok, úgynevezett ingázó fehérjék, melyek hő vagy más stressz körülmények hatására a citoplazmából a sejtmagba vándorolnak (Scharf és mtsai., 1998; Heerklotz és mtsai., 2001; Akerfelt és mtsai., 2010). A HSFA4A fehérje sejten belüli lokalizációjának változása, és hogy az milyen gyorsan megy végbe egy rövidebb stressz hatására eddig nem volt ismert. A citoplazmából a sejtmagba történő transzlokáció megfigyeléséhez az eddig is használt, HSFA4A-YFP fehérjét termelő transzgenikus növények

gyökerét vizsgáltuk kontroll és sóstresszelt körülmények között. A megfigyelésekhez konfokális mikroszkópot használtunk, és ez esetben a megnyúlási zónán belül csak egy-egy sejtre fókuszáltunk (9A. Ábra).



9. Ábra. Sejtmagi lokalizáció. **A)** A HSFA4A transzkripciós faktor gyors felhalmozódása sóstressz (100 mM NaCl) hatására a sejtmagban. A gyökereket sókezeltek, majd a HSFA4A-YFP-ből származó fluoreszcenciát meghatározott időpontokban figyeltük meg az egyedülálló sejtekben. A nyíl a sejtmag helyét jelöli. Méretskála: 20 μ m. **B)** A HSFA4A-YFP fluoreszcencia intenzitás számszerűsített kiértékelése a citoszolban és a sejtmagban. A citoszol 0 időpontjában mért fluoreszcencia értékéhez viszonyított relatív fluoreszcenciát és a standard hibát ábrázoltuk, ahol a 0 időpont = 1. Sókezelés hatására a sejtmagban megnövekszik a fluoreszcencia, míg a citoszolban alig változik. A szignifikanciát *Student t*-tesztel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. Kontroll, K – kontroll körülmény, NaCl, S – sókezelés.

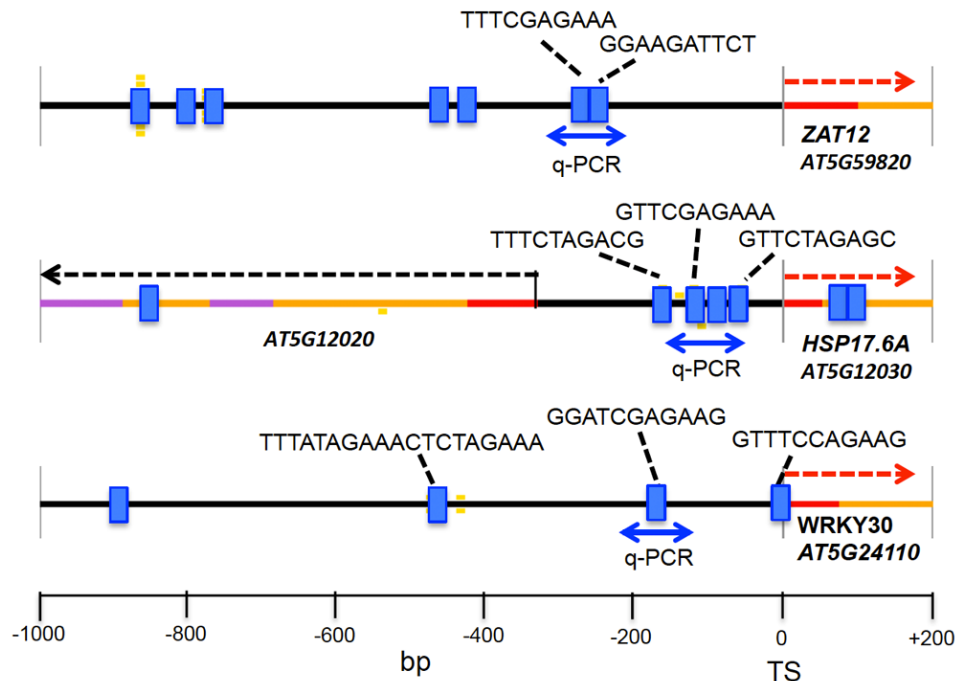
Kontroll körülményekben nem tapasztaltunk változást a HSFA4A-YFP fluoreszcenciában, sem a citoplazmában sem a sejtmagban, de sókezelés hatására a HSFA4A-YFP gyors, erős és ideiglenes sejtmagi felhalmozódását figyeltük meg (9A, B. Ábra). A sóstressz hatására a HSFA4A-YFP sejtmagi felhalmozódása 20 percen belül megtörtént, majd a fluoreszcencia fokozatosan visszanyerte az eredeti mintázatát. A citoplazmában azonban csak egy enyhe YFP-jel erősödést figyeltünk meg a stresszkezelés 20-25. percében (9B. Ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy sóstressz idején a HSFA4A-YFP sejtmagi felhalmozódása egy gyorsan, percekben belül megvalósuló folyamat és valószínűleg a gyors stresszválaszban van szerepe. Eddigi eredményeinkre alapozva valószínűsíthetjük, hogy a sejtmagban történő gyors HSFA4A-YFP fúziós fehérje feldúsulása a génaktiváció és a *de novo* protein bioszintézis előtt történik meg, azonban ez nem zárja ki az újonnan termelődő fehérjék felhalmozódását egy hosszabb sóstressz ideje alatt (8. Ábra).

4.3. A HSFA4A fehérje promoter kötése

A hőszokk faktorok, különféle stressz körülmények között képesek felismerni és megkötni a célgének promoterében található hőszokk elemeket (HSE), és aktiválni e gének transzkripcióját (Miller és Mittler, 2006). Pérez-Salamó és mtsai. (2014) munkájuk során több olyan gént azonosítottak, melyek expressziós mintázata megváltozott a *HSFA4A* túltermelésének következtében, mely azt feltételezi, hogy ezek a gének közvetlen vagy közvetett célpontjai ennek a hőszokk faktornak. Pérez-Salamó és mtsai. (2014) génexpressziós adataira és az általunk végzett promoter analízisre alapozva (AthaMap), kiválasztottunk három olyan gént, melyek promoterei több HSE-t is tartalmaznak, ezáltal akár a *HSFA4A* közvetlen célpontjai is lehetnek (10. Ábra): *HSP17.6A* (egy kis hőszokk protein), *ZAT12* (egy cink-ujj TF) és *WRKY30* (WRKY-típusú transzkripció faktor). A lehetséges célpontok kiválasztása során a stresszben betöltött szerepük is fontos volt. A *HSP17.6A* a hő és ozmotikus stressz (Sun és mtsai., 2001), míg a *ZAT12* és a *WRKY30* a só és oxidatív stressz (Davletova és mtsai., 2005b; Scarpeci és mtsai., 2008, Scarpeci és mtsai., 2013) kivédésében vesznek részt.

A promoter kötés *in vivo* teszteléséhez kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérletet végeztünk, melynek alapja a kromatin izolálás és az immunprecipitáció (IP) után kitisztított DNS-en végzett qPCR, mellyel a hőszokk elemeket tartalmazó fragmentumok dúsulását lehet meghatározni. A fragmentumok dúsulása a YFP-vel jelölt *HSFA4A* transzkripció faktor promoter kötéséből származik.

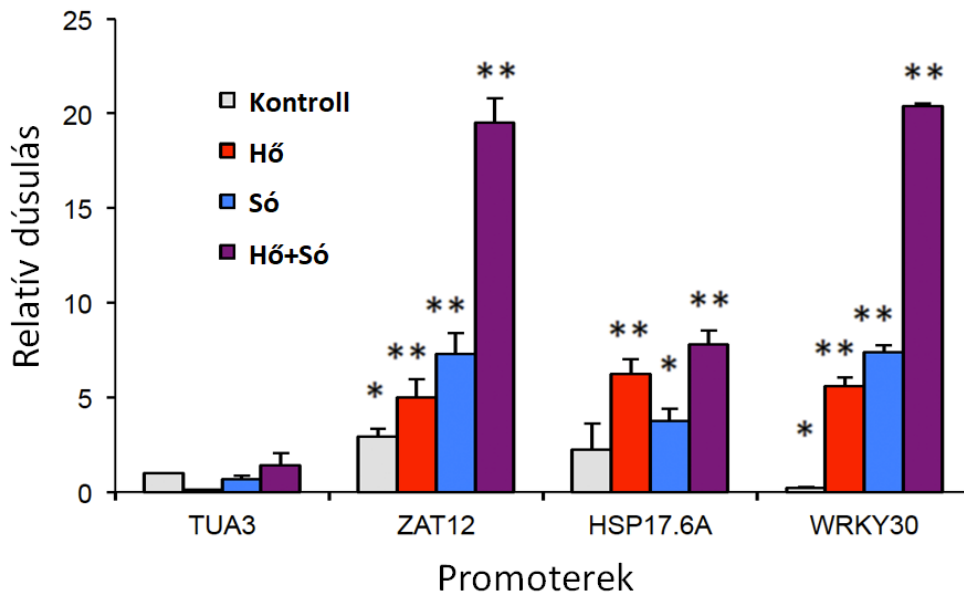
A ChIP-hez kontroll és stresszkezelt pHSFA4A::HSFA4A-YFP transzgenikus növényeket használtunk. A kiválasztott gének HSE-t tartalmazó promoter régióira specifikus, qPCR-ben használható primerpárokat terveztünk, melyek csak azt a szakaszt amplifikálják, amely tartalmaz hősokk elemet (10. Ábra). Ugyanakkor a *TUA3* gén promoterén kiválasztottunk egy olyan régiót, amely nem tartalmaz hősokk elemeket, így ezt nem-specifikus kontrollként használtuk a ChIP során.



10. Ábra. A ChIP során vizsgált célgének promotere. A HSFA4A által kötött *ZAT12*, *HSP17.6A* és *WRKY30* gének promotereinek sematikus térképe az AthaMap alapján. A promoter régiót és a mellette lévő géneket -1000-től +200 bp-ig ábrázoltuk. A fekete vonal az 5' szekvenciát, a piros az 5' UTR régiót, a narancssárga az exonokat, míg a lila az intronokat jelöli. A HSE motívumokat kék téglalapokkal, illetve a hozzátartozó célszekvenciákat felette ábrázoltuk. A szaggatott vonal piros nyíl a transzkripció kezdetét, míg a ChIP során amplifikált cél régiókat kék kettős nyíl mutatja.

A kísérletek során minden esetben sikerült kimutatni a HSFA4A transzkripció faktor különböző promoterekhez való kötését. A hő és a sókezelés is szignifikánsan növelte a relatív dúsulást, azonban míg a hőkezelés mind a három gén esetében nagyjából hasonló módon emelte a promoterkötést, addig a sókezelés jobban erősítette a *ZAT12* és *WRKY30* gének promoterének kötését, mint a *HSP17.6A* promoterét. A kombinált stressz 20-szoros növekedést eredményezett a promoter kötésben a *ZAT12* és *WRKY30* gének esetében, míg a *HSP17.6A* promoter kötése a hőstresszhez hasonló volt. A stresszkezelések során megfigyeltek alapján elmondható, hogy a HSFA4A transzkripció faktor kötődése a *HSP17.6A* gén HSE elemeket tartalmazó promoter

régiójához, jellemzően inkább a hőstresszre emelkedik meg. A *TUA3* gén promoter kötése, az elvártaknak megfelelően, nem változott a kezelések hatására, vagyis a HSFA4A nem volt képes a promoter kötésére (11. Ábra).



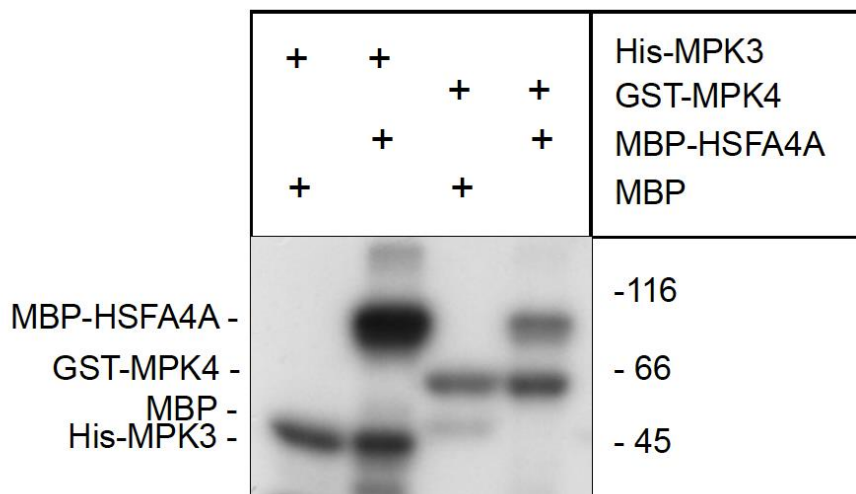
11. Ábra. Promoter kötés vizsgálata CHIP technikával. A HSFA4A promoter kötését CHIP technikával vizsgáltuk, pHSA4A::HSFA4A-YFP génkonstrukciót hordozó transzgenikus növényeken. A növényeket sókezeltük (150 mM NaCl, 6h), hőkezeltük (37°C, 6h), illetve ezek kombinációját (kombinált stressz, 6h) használtuk. Az eredményeket relatív dúsulásként és a hozzátartozó standard hibával ábrázoltuk, melyhez a referencia gén (*TUA3*) promoterén kapott értéket 1-nek vettünk. Az ábrán látható, hogy a különböző stresszkezelés nagyobb dúsulást eredményez. A *TUA3* promoter szakaszon kapott CHIP értékekhez viszonyított szignifikanciát *Student t*-teszttel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. ZAT12, HSP17.6A és WRKY30 – cél promoter régiók, *TUA3* – referencia promoter régió, Kontroll – kontroll körülmények, Hő – hőkezelés, Só – sókezelés, Hő+Só – kombinált stressz.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a HSFA4A transzkripció faktor képes közvetlenül megkötni a három célgén promoterében található hőszokk elemeket, és ezáltal közvetlenül szabályozhatja azok transzkripció szintjének változását. A promoter kötés erősségét a stressz típusa és a célgén stresszben betöltött szerepe is befolyásolhatja.

4.4. MAP kináz 4 (MPK4) foszforiláció *in vitro* körülményekben

A fehérjék poszt-transzlációs módosítása, mint a foszforiláció, szumoiláció vagy ubikvitináció, befolyásolja azok aktivitását, működését vagy akár degradációját is. Csoportunk korábban már kimutatta, hogy az MPK3 és MPK6 képes *in vitro* foszforilálni a HSFA4A fehérjét, illetve sikerült azonosítani öt olyan aminosavat, melyek ezen MAP kinázok célpontjai lehetnek természetes körülmények között is. A korábbi kísérletek eredményei alapján arra

következtettünk, hogy a foszforilációs helyek közül a Ser309 (szerin 309) aminosav a domináns foszforilációs célpontja a fent említett két kináznak (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). A továbbiakban annak akartunk utánajárni, hogy az azonosított kinázok mellett milyen más MAP kináz vehet részt a HSFA4A foszforilációjában. A növények több MAP kináz kaszkádon alapuló stressz-jelátviteli úttal rendelkeznek, melyek közül az MPK4 kinázhoz kapcsolódik az egyik legismertebb szabályozási rendszer. Az MPK4 jelviteli út, többek között szerepet játszik a patogének elleni védelemben és a ROS homeosztázis fenntartásában (Pitzschke és mtsai., 2009; Dóczi és Bögre, 2018). Az előzetes eredmények ismeretében kíváncsiak voltunk, hogy van-e kapcsolat a HSFA4A transzkripciós faktor és a MPK4 között, foszforilálja-e a kináz ezt a transzkripciós faktort. Eredményeink kimutatták, hogy a HSFA4A transzkripciós faktort az MPK3 kináz mellett az MPK4 kináz is foszforilálja *in vitro* körülmények között (12. Ábra).



12. Ábra. A HSFA4A fehérje *in vitro* foszforilációja. Az MBP-jelölt HSFA4A proteint foszforilálta mind a His-MPK3, mind a GST-MPK4 MAP kináz is. MBP-HSFA4A – maltóz-kötő fehérjével jelölt HSFA4A, His-MPK3 – polihisztidin jelölt MPK3, GST-MPK4 – glutation S-transzferáz jelölt MPK4, MBP – maltóz-kötő fehérje

Az *in vitro* foszforiláció radioaktív kimutatása mellett tömegspektrometriás mérésekkel is teszteltük a HSFA4A MPK4 általi foszforilációját. A mérések során a következő aminosavak foszforilációját sikerült kimutatni: Thr124, Ser198, Ser239, Ser309, Thr396 és Ser397 (13. Ábra). Az azonosított foszforilációs helyek közül négy megegyezik a Pérez-Salamó és mtsai. (2014) munkája során azonosított és az MPK3 által foszforilált aminosavakkal (Ser198, Ser239, Ser309, Thr396). A tömegspektrometriás mérések során végzett számítások segítségével kimutattuk, hogy az MPK4 80%-ban képes foszforilálni a fellelhető Ser309 helyeket, azaz az MPK3 és MPK6 kinázokhoz hasonlóan szintén ezt a foszforilációs helyet részesíti előnyben.

Ezzel szemben a többi szerin vagy treonin csoportot az MPK4 sokkal kisebb, csak 0,1-8%-os arányban foszforilálja (13. Ábra).

Aminosav hely	Detektált foszforiláció	Jel %
T124	KPVHSHSLPNLQAQLNPL p TDSER	0.1
S198*	TMVSFVSQVLEKPGGLALNL ps PCVPETNER	0.4
S239*	TCVVVREEGST ps PSSHTR	8.0
S239*	EEGST ps PSSHTR	4.5
S309*	LKSPP ps PR	79.9
T396*	NVNAITEQLGHL p TSSER	0.3
T396*	NVNAITEQLGHL p TSSERS	1.0
S397	NVNAITEQLGHL ps SERS	0.2

13. Ábra. Tömegspektrometriával (MS – mass spectrometry) *in vitro* azonosított foszforilációs helyek listája. A foszforilált aminosavak piros betűkkel vannak jelölve. Az MPK4 kináz által *in vitro* foszforilált MBP-jelölt HSFA4A transzkripciós faktort *in-gel* emésztették tripszinnel, majd tömegspektrometriás vizsgálatokat végeztek. A %-os értékek nem abszolút foszforilációs arányt mutatnak.

4.5. *In vivo* foszforilációs helyek azonosítása

Az *in vitro* körülmények között végzett foszforilációs kísérletek mellett, fontosnak tartottuk azt, hogy *in vivo* rendszerben is tanulmányozzuk a HSFA4A lehetséges foszforilációját. Az így azonosított foszforilációs helyeket összehasonlítottuk az *in vitro* vizsgálatok során kapott adatokkal, illetve bioinformatikai módszerekkel megnéztük azok eloszlását és konzerváltságát a HSFA4-típusú növényi hősook faktorok között. Az *in vivo* kísérletekhez a HSFA4A-YFP fehérjét az eddig is használt pHSFA4A::HSFA4A-YFP transzgenikus növényekből tisztítottuk ki. A kontroll és sókezelt (150 mM NaCl, 6 óra) növényekből kinyert fehérje mintákon immunprecipitációt végeztünk, majd a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatócsoport laboratóriuma tömegspektrometriával azonosította a foszforilációs helyeket (14. Ábra). A Ser239 és Ser309 foszforilációját mindkét kísérletben sikerült kimutatni. Érdeemes megjegyezni, hogy a Ser309 az *in vitro* vizsgálatok során is a legfontosabb MPK4 foszforilációs célpontnak bizonyult (15. Ábra, 3. Táblázat). Szintén sikerült kimutatni a Ser112 és a Ser306 aminosavak *in vivo* foszforilációját (14. Ábra), azonban ezeket a helyeket nem foszforilálták a MAP kinázok az *in vitro* kísérletek során (13. Ábra).

<u>Aminosav hely</u>	<u>Detektált foszforiláció</u>
S112	RKPVHSH p SLPNLQAQLNPLTDSER
S112	KPVHSH p SLPNLQAQLNPLTDSER
S239	TCVVVREEG STp SPSSHTR
S239	EEG STp SPSSHTR
S306, S309	LK p SPP p SPR
S306	LK p SPPSPR
S309	LKSPP p SPR

14. Ábra. *In vivo* foszforilációs helyek meghatározása. A HSFA4A-YFP fúziós fehérjét pHSFA4A::HSFA4A-YFP transzgenikus növényi mintából immunprecipitáltuk, majd tömegspektrometriával határozták meg a foszforilációs helyeket. A kék betűk a foszforilált aminosavakat jelölik.

A két foszforilációs kísérlet összehasonlítása alapján elmondható, hogy a Ser239 és Ser309 valóban a MAP kinázok elsődleges foszforilációs célpontjai lehetnek. Számítógépes becslések alapján valószínűsíthető, hogy a másik két azonosított aminosavat más protein kinázok foszforilálják, mint a PKA, CDK, CK1, CK2 és GSK3 (3. Táblázat). Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a HSFA4A egy összetett poszt-transzlációs szabályozáson megy keresztül, és a MAPK típusú protein kinázokon kívül más kináz csoportok is képesek foszforilálni és befolyásolni a működését.

MDENNHGVSSSSLPFLTKTYEMVDDSSSDSIVSWSOSNKSFIWNPPEF
SRDLLPRFFKHNNFSSFIROLNTYGFRKADPEOWEFANDDFVRGQPHLMK
NIHRKPVHSHSLPNLQAQLNPLTDSERVRMNNQIERLTKEKEGLLEELH
KQDEEREVFEMQVKELKERLQHMENKQKTMVSFVSQVLEKPGGLALNLS**PC**
VPETNER**KRRFPR**IEFFPDEPMLEENKTCVVVREEG**STp**SSHTREHQVE
QLESSIAIWENLVSDSCESMLQSRSMMLDLDVDESSTFPESPPLSCIQLSV
DSRLK**SPPp**PRIIDMNCEPDGSKEQNTVAAPPPPPVAGANDGFWQOFFSE
NPGSTEQREVQLERKDDKDKAGVRTEKCWWNSRVNAITEQLGHL**TS**SER
S

15. Ábra. A HSFA4A aminosav szekvenciája. Az MPK3 (Pérez-Salamó mtsai., 2014) és MPK4 (ez a tanulmány) által *in vitro* körülmények között foszforilált aminosavak piros betűvel, míg az immunprecipitált mintákból azonosított foszforilációs helyek kék betűvel vannak jelölve. A mindkét, *in vitro* és *in vivo*, kísérletben azonosított foszforilációs helyeket kék színnel bekeretezve jelöltük. A zöld betűk a feltételezett MAPK kihorgonyzó motívumot (RKRRFPR) jelöli. A konzervált DNS-kötő régió alá van húzva.

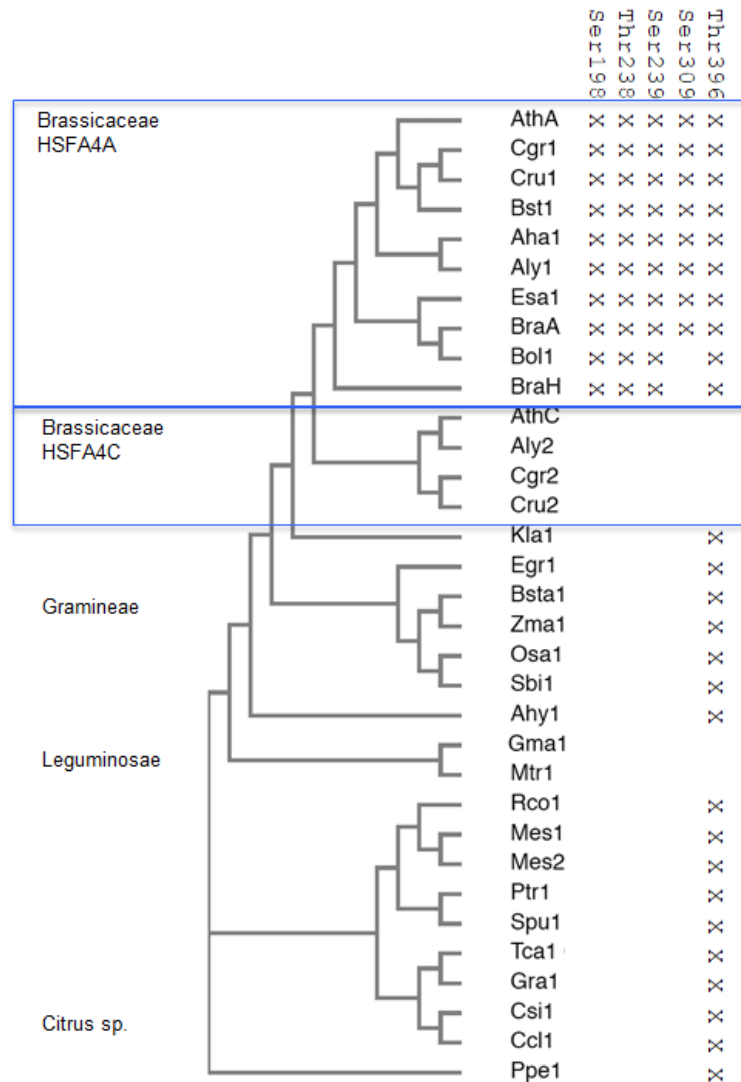
3. Táblázat. A HSFA4A foszforilációs kísérletek összefoglalása. A foszforilációs hatékonyságot „+”-al jelöltük. A növekvő hatékonyságot (+), +, ++, +++ jeleztük. A HSFA4A foszforilációs predikciókat két weboldal eszközével csináltuk: NepPhos3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) és GPS 3.0 prediction tool (<http://gps.biocuckoo.org/index.php>). Az MPK4 *in vitro* és *in vivo* foszforilációs kísérleteket ebbe a tanulmányban végeztük, míg az MPK3 és MPK6 *in vitro* foszforilációs kísérleteket egy előző publikációban írtuk le (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	NetPhos prediction	GPS3.0 Prediction
amino acid	MPK3	MPK6	MPK4	Mass Spec.	minimum score: 0.5	minimum score: 6
S9				+	PKA	CK1
S10				+	PKC	
S11				+		
S12				+		
S65				+	PKC	
S66				+		
S110				+++		
S112				+++	PKA, CDC2, DNAPK	CK1, NEK, TLK
T124			(+)		CK2	
S198	+		(+)		GSK3	
S237				++	GSK3	STE
T238	+			++		
S239	+		++	++	MAPK	MAPK, CK1, CDK
S241				+		CK2
S242				+		TK, STE
S306				+	CDK5, RSK, GSK3, MAPK	MAPK
S309	+++	+++	+++	+++	MAPK, GSK3	MAPK
S322				+		
T327				+		
T389	(+)					
T396	+	+	+		CK2	
S397	(+)		(+)			
S401	(+)					

4.6. A HSFA4-típusú TF-ok foszforilációja a növényekben

A foszforilációs helyek összehasonlító elemzéséhez többszörös aminosav szekvencia illesztés segítségével megvizsgáltuk 27 növényfaj 33 HSFA4-típusú transzkripciós faktorjának aminosav sorrendjét (F1. Ábra, F2. Táblázat). A szekvencia analízis eredményeként elmondható, hogy a Ser112 hely jelen van minden vizsgált növényfaj HSFA4 fehérjében, míg a Thr124, Ser306 és Thr396 helyek a legtöbb fehérjében konzerváltak. Érdekes, hogy a Ser198, Ser239 és Ser309 aminosavak csak a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó, közeli rokonfajok (*A. thaliana*, *Arabidopsis halleri*, *Capsella rubella*, *Brassica rapa* és *Eutrema salsugineum*) HSFA4A-típusú proteinjeiben van jelen. Meglepő módon a Thr396 foszforilációs hely hiányzik az *Arabidopsis* HSFA4C és másik öt HSF rokon fehérjéből a *Brassicaceae* fajokon belül (16. Ábra, F1. Ábra, F2. Táblázat). A konzervált MAPK kötő régió minden HSFA4-típusú fehérjében jelen van (15. Ábra, F1. Ábra). Az eredmények rámutattak arra, hogy a konzervált foszforilációs helyek jelen vannak a legtöbb növényi HSFA4-típusú transzkripciós

faktorban, ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy az MPK3, MPK4 és MPK6 kinázok és a HSFA4 transzkripciós faktorok közötti foszforilációs kapcsolat fontos szerepet tölthet be a *Brassicaceae* családban.

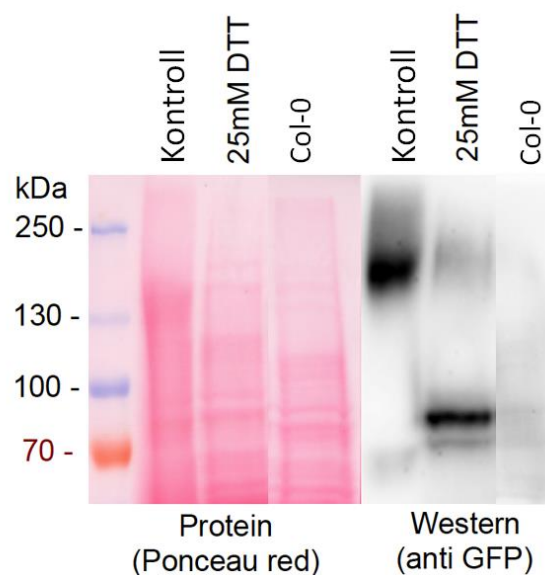


16. Ábra. A 25 növényfajban azonosított HSFA4-típusú fehérje filogenetikai fája. A filogenetikai fa 27 növényfaj 33 HSFA4-típusú fehérje, *Arabidopsis thaliana* fajban azonosított, MAP kináz által foszforilált aminosav helyeket hasonlítja össze (a foszforiláció jelenlétét „X”-el jelöltük). A káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó fajokat bekereteztük.

4.7. A foszforiláció és a redox állapot hatása a HSFA4A fehérje multimerizációjára

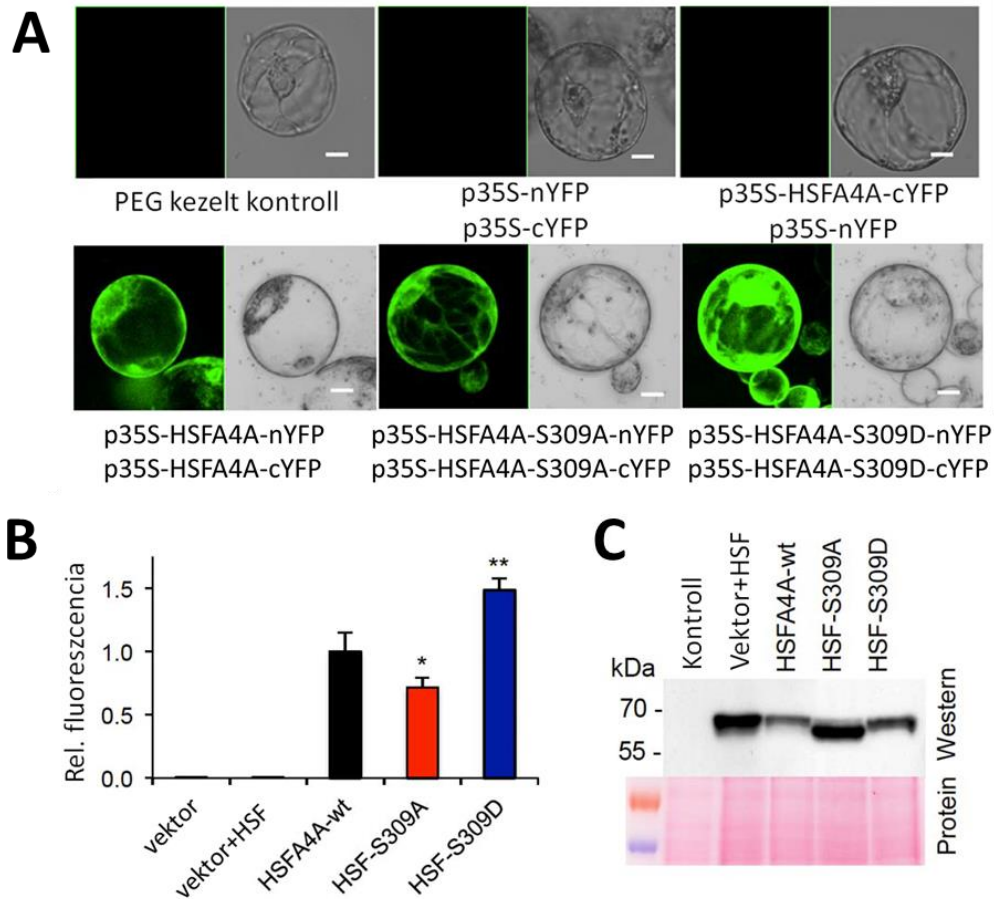
A hőszokk faktorok trimerizációja fontos szerepet játszik a hőszokk elemek felismerésében és az azokhoz való kapcsolódásban, ami elengedhetetlen a célgén transzkripciós aktiválásához (Miller és Mittler, 2006; Akerfelt és mtsai., 2010). Több modell is azt sugallja, hogy a foszforilációnak is fontos szerepe van a hőszokk faktorok működésében (Shinozaki és

mtsai., 2015), így elképzelhető, hogy szerepe van a trimerek kialakulásában, stabilitásában, a HSE felismerésben, illetve befolyásolhatja a HSF-HSE kötődés stabilitását. Korábban már sikerült *in vivo* kimutatni a HSFA4A intramolekuláris dimerizációját, amiben fontos szerepet töltenek be a konzervált redox érzékeny cisztein csoportok, amik stabilizálják a fehérjék közti interakciót (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). Korábbi eredmények szerint a HSFA4A részt vesz a ROS felhalmozódással járó só, fény és oxidatív stresszválaszban (Davletova és mtsai., 2005a; Pérez-Salamó és mtsai., 2014). Az előzetes eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a sejtekben megváltozott redox-egyensúly hatással lehet a HSF multimerizációra is. A HSFA4A fehérje *in vivo* multimerizációjának vizsgálatához összfehérjét tisztítottunk a HSFA4A-YFP-t termelő transzgenikus növényekből, majd nem-denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottuk a különböző molekulásúlyú fehérjéket, és Western hibridizációval anti-GFP ellenanyaggal detektáltuk a YFP-jelölt fehérjéket. A nem kezelt fehérje mintában egy megközelítőleg 200-250 kDa méretű fehérje komplexet figyeltünk meg, míg a DTT kezelt mintában, redukáló közegben, csökkent a komplex jelének erőssége és egy kisebb, 70-80 kDa molekulásúlyú sávot észleltünk, mely megfelel a YFP-jelölt HSFA4A monomer fehérje méretének (17. Ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy a HSFA4A nagyobb komplexek formájában van jelen az *Arabidopsis* növényekben, melyek stabilitását a sejtek redox állapota képes befolyásolni.



17. Ábra. Lehetséges HSFA4A-YFP multimer pHSFA4A::HSFA4A-YFP génkonstrukcióval transzformált *Arabidopsis* növényekben. A fehérje extraktumokat DTT-vel kezeltük, majd nem-denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottuk a fehérjéket. Az elválasztott fehérjéket elektroblottolással membránra vittük át, majd anti-GFP ellenanyaggal detektáltuk a fúziós fehérjét. Ezután a membránt Ponceau Red-el festettük. 130 és 250 kDa között a feltételezett multimer, illetve 70 és 100 kDa között HSFA4A-YFP monomer. Kontroll – nem DTT kezelt minta, 25 mM DTT – DTT kezelt minta.

Az eddigi eredmények alapján feltételeztük, hogy a Ser309 helyen történő foszforilációnak szerepe lehet a HSFA4A fehérje működésében, esetleg annak multimerizációjában. A Ser309 foszforiláció funkciójának tanulmányozása érdekében helyspecifikus mutagenézis segítségével módosítottuk a szerin aminosavat alaninra, illetve aszpartátra. Az alanin cserével egy nem-foszforilálódó mutánst (HSF-S309A), míg az aszpartát cserével egy foszforilációt imitáló mutánst (HSF-S309D) hoztunk létre. Az így kapott mutáns és a vad típusú HSFA4A (HSFA4A-wt) változatokat fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas vektorokba klónoztuk, majd bimolekuláris fluoreszcens komplementáció (BiFC) segítségével *in vivo* vizsgáltuk a fehérje dimerizációt. A kísérletek során *Arabidopsis* eredetű protoplasztokba transzformáltuk a fent említett vektorokat, és megfelelő kontrollok mellett konfokális mikroszkóppal detektáltuk az esetleges YFP fluoreszcenciát. A mikroszkópia során mindhárom HSFA4A változattal (vad típusú HSFA4A, HSF-S309A és HSF-S309D mutáns) transzformált protoplasztokban észleltünk YFP fluoreszcenciát, mely a fehérjék dimerizációjára utal. A kontroll protoplasztok esetében, melyeket csak üres BiFC vektorokkal vagy üres BiFC és HSFA4A-wt vektorokkal transzformáltunk, nem tapasztaltunk fluoreszcenciát (18A. Ábra). Az észlelt fluoreszcencia intenzitásokat számszerűsítettük, hogy a kölcsönhatások intenzitását megbecsüljük. Az összehasonlításból kiderült, hogy a HSF-S309A mutáns 30%-al gyengébb, míg a HSF-S309D mutáns 50%-al erősebb fluoreszcencia intenzitást adott, mint a vad típusú HSFA4A (18B. Ábra). A transzformált protoplasztokban termelt fúziós fehérjék mennyiségének összehasonlítása érdekében Western blot technikával teszteltük a HSFA4A-YFP protein abundanciáját. A kontroll minta kivételével, minden esetben sikerült kimutatni a fúziós fehérjék jelenlétét a transzformált protoplasztokban (18C. Ábra). Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a HSFA4A foszforilációja az S309-es helyen ugyan nem esszenciális, azonban pozitívan képes befolyásolni a dimerizációt.

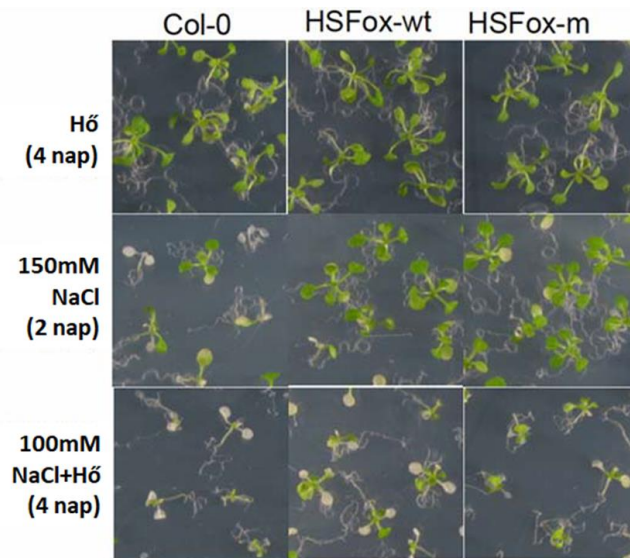
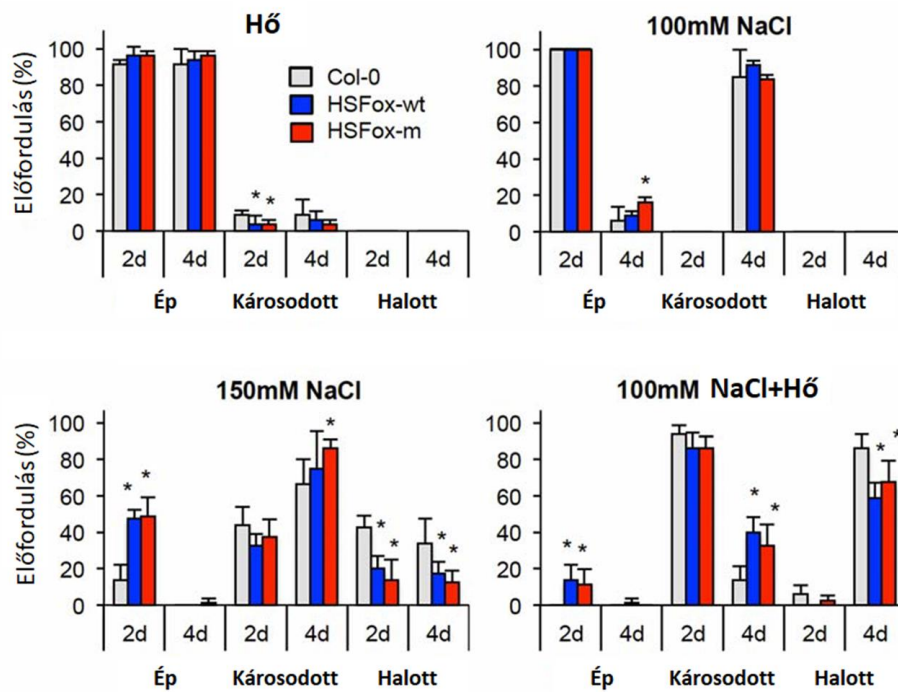


18. Ábra. Multimerizációs kísérletek. **A)** BiFC kísérletek során megfigyelt protoplasztok képe. A vizsgálatok során többféle kontrollt használtunk (felső sor, PEG kezelt protoplasztok, üres vektorral vagy üres és cYFP-jelölt HSFA4A vektorral transzformált protoplasztok), illetve a protoplasztokat n/cYFP-jelölt HSFA4A (HSFA4A-wt) nem módosított és mutáns (HSF-S309A, HSF-S309D) változataival (alsó sor) transzformáltuk. Méretskála: 10 μ m **B)** A BiFC kísérletek során kapott fluoreszcencia jelek számszerűsített kiértékelése. A relatív fluoreszcenciát és a standard hibát ábrázoltuk, ahol 1 egyenlő a nem módosított p35S-HSFA4A-n/cYFP konstrukciókkal transzformált protoplasztokból származó YFP jellel. A szignifikanciát *Student t-teszt*tel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. **C)** Western blottal ellenőriztük a fúziós fehérjék termelődését a transzformált protoplasztokban, melyhez anti-GFP ellenanyagot használtunk. Kontroll – PEG kezelt protoplasztok, vektor – p35S-n/cYFP, vektor+HSF – p35S-nYFP és p35S-HSFA4A-cYFP, HSFA4A-wt - p35S-HSFA4A-n/cYFP, HSF-S309A – p35S-HSFA4A-S309A-n/cYFP, HSF-S309D – p35S-HSFA4A-S309D-n/cYFP génkonstrukciókkal transzformált protoplasztok.

4.8. A foszforilációt imitáló HSFA4A mutáns szerepe a stresszválaszban

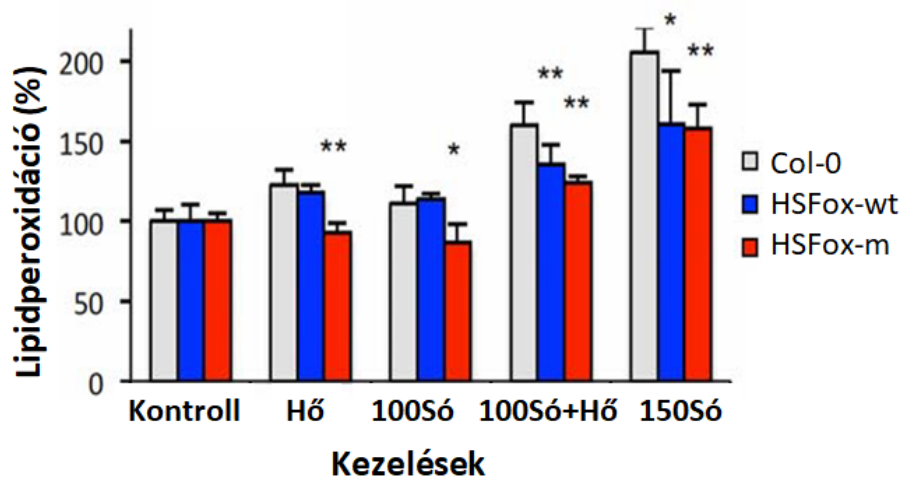
Több korábbi kutatás is rávilágított arra, hogy a *HSFA4A* túltermelése megnöveli a stressztűrést különböző káros körülménynek kitett *Arabidopsis* növényekben (Pérez-Salamó és mtsai., 2014; Faragó és mtsai., 2018), azonban az nem ismert, hogy a HSFA4A foszforilációja hogyan befolyásolja a stressz szembeni választ. A túltermelés és a foszforiláció hatását kétféle transzgenikus *Arabidopsis* növény segítségével vizsgáltuk, az egyik a nem módosított pER8-HSFA4A (HSFox-wt), míg a másik a foszforilációt imitáló mutáns, pER8-HSFA4A-S309D

(HSFox-m) túltermelő vonalak voltak. A túlélés teszt során a túltermelő és a Col-0 magokat kicsíráztattuk és tíz napig neveltük kontroll körülmények között, majd két vagy négy napig só, vagy hő, illetve kombinált stresszkezeléseknek tettük ki a növényeket. A stressz kezelés után a növényeket visszahelyeztük normál növekedési körülmények közé. Tíz nap regenerációs idő után megszámoltuk a túlélő (ép és károsodott) és a halott növényeket (19. Ábra). A két és négynapos hőstressz önmagában nem volt szignifikáns hatással a növények túlélésére, szinte 100%-ban életben maradtak. A kétnapos hőstressz után ugyanakkor kevesebb túltermelő növény károsodott, mint vad típusú. A sóstressz túlélésre gyakorolt hatása függött a kezelés erősségétől, a 100 mM NaCl koncentráció esetében két nap után minden növény túlélte és ép volt, azonban a négynapos stresszkezelés után az ép növények aránya 20% alá csökkent, míg a HSFox-m növények közül szignifikánsan több maradt épen, de a károsodottak között nem volt jelentős a különbség. A 150 mM NaCl koncentrációjú kezelés és a 100 mM NaCl és hőstressz kombinálása esetén, a két HSFA4A változat túltermelése egyértelműen kedvező hatással volt a stressztűrésre, ezáltal pedig a túlélésre. A magas sókoncentráció esetén a túltermelő növények 50%-a, míg a Col-0 növényeknek csak a 15%-a tudott teljesen regenerálódni. A letalitás szempontjából fordított volt az arány: a túltermelők 15-20%-a, míg a vad típusnak 40%-a pusztult el a kétnapos stresszkezelés után. A négynapos sóstressz után nem maradt ép növény, azok nagy része károsodott. A négynapos só kezelés után a vad típusú növények 35-40%-a elpusztult, míg a túltermelő növények esetében szignifikánsan kisebb, 15-18% volt a letalitás (19A, B. Ábra). A kétnapos kombinált stressz (100 mM NaCl és hőstressz) után a túltermelő növények 15%-a regenerálódott és ép maradt, azonban a vad típusú növények esetében csak károsodott és halott növényeket találtunk. A négynapos kombinált stressz után 10% vad típusú és 30-40% túltermelő növény maradt életben, ezek nagyobb része súlyosan károsodott (19A, B. Ábra). Kontroll körülmények között minden növény túlélte, de a 150 mM NaCl kezeléssel kombinált hőstressz után nem maradt élő növény, ezért ezeket nem ábrázoltuk. Az általunk alkalmazott stressz körülmények között, mindkét *HSFA4A* forma (nem módosított *HSFA4A* és *HSFA4A-S309D* mutáns) túltermelése hasonló eredményt adott, azaz mindkét forma hasonló módon volt képes a stressztűrést pozitívan befolyásolni. Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a *HSFA4A* túltermelése nem csak az egyedien ható só- és hőstressz, de kombinált stressz során is képes megnövelni a növények túlélését.

A**B**

19. Ábra. A HSFA4A túltermelése. A *HSFA4A* transzkripciós faktor túltermelése *Arabidopsis* Col-0 növényekben jobb stressztűrést eredményez két- vagy négy napos só- (100 mM, 150 mM NaCl), hő- (37°C nappal és 30°C éjjel) és kombinált stressz (só- és hőstressz kombinálása) esetén. **A)** A vad típusú és túltermelő *Arabidopsis* Col-0 növények növekedése stresszkezelés után. **B)** Az ép, károsodott és halott növények előfordulása (%-ban) standard hibával, a két- és négy napos stresszkezelések után. A kontroll (mind egészséges és túlélte) és 150 mM só- és hőstressz kombinált (mind halott) körülmények között nevelt növények eloszlását nem ábrázoltuk. A szignifikanciát *Student t-teszt*tel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. Col-0 – *Arabidopsis* Col-0, HSFox-wt – nem módosított pER8-HSFA4A túltermelő, HSFox-m – mutáns pER8-HSFA4A-S309D túltermelő növények, Hő – hőstressz, 100 mM NaCl és 150 mM NaCl – sóstressz, 100 mM NaCl+Hő – kombinált stressz, 2d, 4d – 2 és 4 napos stresszkezelés.

Élettani szempontból is megvizsgáltuk a vad típusú és mutáns *HSFA4A* génváltozatok hatását, és megmértük a stresszkezelések után fellépő oxidatív károsodás mértékét. A különböző kedvezőtlen környezeti körülmények reaktív oxigén származékok keletkezéséhez vezetnek, melyek a növények oxidatív károsodását eredményezhetik. A ROS-ok hatására meggyégbe a lipidperoxidáció, mely során a membránok károsodnak és malondialdehid (MDA) keletkezik. Az MDA mennyiségének mérésével következtetni lehet a károsodás mértékére, ezért a vad típusú és túltermelő növényekben (HSFox-wt és HSFox-m) a só-, hő- és kombinált stressz során felhalmozódott ROS által okozott oxidatív károsodást TBARS teszt segítségével mértük meg. A lipidperoxidáció mértéke a vad típusú növényekben a stresszkezelések erősségének megfelelően növekedett. A *HSFA4A* túltermelő növények esetében a lipidperoxidáció mértéke a Col-0 növényekhez képest általában alacsonyabb vagy hasonló mértékű volt (20. Ábra).



20. Ábra. Lipidperoxidáció mértéke a vad típusú és túltermelő növényekben stresszkezelés után. A kontroll körülményekhez viszonyított százalékos változás és standard hiba van ábrázolva. A 150 mM sóstressz és hőstressz kombinációja nincs ábrázolva, mert a növények elpusztultak. A szignifikanciát *Student t-teszt*tel számoltuk ki, ahol * esetén $p < 0,05$, míg ** esetén $p < 0,01$. Col-0 – *Arabidopsis* Col-0, HSFox-wt – nem módosított pER8-*HSFA4A* túltermelő, HSFox-m – mutáns pER8-*HSFA4A*-S309D túltermelő növények, Kontroll – kontroll körülmény, Hő – hőstressz, 100Só – 100 mM NaCl sóstressz, 100Só+Hő – 100 mM NaCl sóstressz kombinációja hőstresszrel, 150Só – 150 mM NaCl sóstressz.

Az enyhébb sókezelés (100 mM NaCl) és a hőstressz során a HSFox-m esetében szignifikánsan alacsonyabb mértékű maradt a lipidperoxidáció, mely hasonló volt a kontroll körülmények során mért értékekhez. A kéttípusú *HSFA4A* túltermelése jelentősen csökkentette a lipidperoxidáció mértékét magas só (150 mM NaCl) és kombinált stressz (100 mM NaCl és hőstressz) során. A sókezelésnél közel 50%-kal, míg a kombinált stressz esetében majdnem

30%-kal csökkentette az oxidatív károsodást (20. Ábra). A kombinált stressz (150 mM NaCl és hőstressz) esetén nem tudunk lipidperoxidációt mérni, mert a növények elpusztultak. Eredményeink arra utalnak, hogy a *HSFA4A* túltermelése nem csak egyedi, hanem kombinált stressz során is képes csökkenteni az oxidatív károsodás mértéket, illetve enyhébb stressz körülmények között a foszforilációnak is szerepe lehet az oxidatív károsodás mérséklésében.

5. Eredmények megvitatása

A növényeknek a kedvezőtlen környezeti feltételekre kialakuló élettani vagy fejlődési válaszáat egy összetett jelátviteli rendszer szabályozza, melyben az információ az ioncsatornákon, a MAP kináz kaskádokon, a hormonokon és másodlagos hírvivő molekulákon, mint a Ca^{2+} -on keresztül jut el a transzkripciós faktorokig, melyek a célgének működését szabályozzák. Ilyen transzkripciós faktorok lehetnek például a MYB, MYC, ICE, bZIP, WRKY és természetesen a HSF-típusú faktorok is. A hőszokk faktorokat korábban elsősorban a hőstresszel hozták összefüggésbe, azonban számos kutatás rávilágított arra, hogy a növényekben a sokféle HSF sokkal változatosabb szerepet tölt be, mint az állatokban vagy élesztőben. A HSF variánsok a különböző stresszválaszokat szabályozzák. Működésük és aktivitásuk, többek között transzkripciós és poszt-transzlációs szinten, a sejten belüli transzporttal és más fehérjékkel történő interakciókkal befolyásolható (Akerfelt és mtsai., 2010; Scharf és mtsai., 2012). Munkám során a HSFA4A transzkripciós faktornak a jellemzését folytattam, hogy a környezeti stresszben betöltött szerepét jobban megértsük.

5.1. HSFA4A a transzkripciótól a sejtmagi lokalizációig

Korábbi munkák kimutatták, hogy a HSFA4A többféle abiotikus stresszválaszban is részt vesz, szerepe van a só-, oxidatív-, nehézfém- és hőstressz tolerancia kialakulásában (Pérez-Salamó és mtsai., 2014; Lin és mtsai., 2018). Azonban egyedi vagy kombinált stresszben betöltött pontos szerepe vagy a sejten belüli lokalizációjának változása nem volt teljes mértékben tisztázott. Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a HSFA4A szabályozását, különböző stresszkezeléseket alkalmazva tanulmányoztuk a génexpresszióját, a fehérje mennyiségének változását és sejten belüli lokalizációját. Kimutattuk, hogy sókezelés hatására a *HSFA4A* génexpressziója már néhány óra alatt megemelkedik, míg hő és kombinált stressz esetében inkább egy hosszabb, markánsabb hatás szükséges az indukciójához. Hasonló eredményeket kaptunk a fehérje mennyiségének vizsgálata során is, melyből arra következtethetünk, hogy a HSFA4A fehérje mennyiségét elsősorban a transzkripció szabályozza. Láthatjuk, hogy a *HSFA4A* több típusú stresszre is reagál, azonban, hogy a kedvezőtlen körülmények milyen transzkripciós faktorokon keresztül szabályozzák a génexpresszióját, az nem ismert. Az internetes adatbázisok, ChIP-seq és DAP-seq adatai arra utalnak, hogy többféle családba tartozó transzkripciós faktorok képesek a HSFA4A promotereéhez kapcsolódni. A szabályozó fehérjék között lehetnek a HSFA1B, bZIP, WRKY,

C2H₂, MYB és más HSF-típusú faktorok is (O'Malley és mtsai., 2016; Albihiyal és mtsai., 2018).

A különböző káros környezeti hatások, mint só és hőstressz, vagy ezek kombinációja befolyásolják a HSFA4A transzkripciós szabályozását, illetve befolyásolják a fehérje mennyiségi változását is. Ugyanakkor a transzkripciós faktor aktivitása függ annak sejten belüli térbeli helyzetétől, a másodlagos módosításoktól, illetve a sejt belsejében uralkodó körülményektől. A hőszokk faktorok aktivitását a citoplazma és a sejtmag közti import és export közötti egyensúly is szabályozza (Scharf és mtsai., 2012). A stressz során keletkező ROS-ok, mint a H₂O₂, képes stabilizálni a HSF-ok aktív trimer formáját (Miller és Mittler, 2006; von Koskull-Döring és mtsai., 2007), ezáltal a sejtekben történő redox változások is hatással vannak a faktorok működésére. Konfokális mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a HSFA4A stressz hiányában a gyökérsejtek citoplazmájában és sejtmagjában egyaránt jelen van, viszont néhány perces sókezelés gyors sejtmagi felhalmozódáshoz vezetett. Ez megegyezik több más kutatás eredményével, melyek szerint az inaktív HSF-ok főleg a citoplazmában lokalizálódnak, majd stressz hatására megtörténik a sejtmagi import, ahol a célgének promotor régióiban található HSE-hez kapcsolódva aktiválják azokat (Scharf és mtsai., 1998; Heerklotz és mtsai., 2001; Scharf és mtsai., 2012). Érdeemes megemlíteni, hogy a sejtmagi lokalizációs szignál a legkonzerváltabb része a növényi HSF aminosav szekvenciáknak (F1. Ábra). A növényekben nem ismert a sejtmagi transzport folyamata, azonban az állati modelleken végzett kutatások arra utalnak, hogy speciális transzport fehérjék segítségével jutnak be a sejtmagba ezek a faktorok (Wang és Lindquist, 1998). Scharf és mtsai. (1998) paradicsomban kimutatták, hogy a hőszokk faktorok megfelelő transzportjában fontos szerepet játszanak az A1 és A2 típusú HSF-ok, így ezek a transzkripciós faktorok nagyobb komplexek formájában is jelen lehetnek a növényi sejtekben. Ezt támasztják alá eredményeink is, amelyek megerősítették, hogy a HSFA4A nagyobb komplexek formájában van jelen a transzformáns *Arabidopsis* növények sejteiben. Redukáló környezetben ezeknek a komplexeknek a mennyisége csökkent, míg a HSFA4A monomereké pedig növekedett. Feltételezhetjük, hogy a komplex alkotói különböző hőszokk proteinek (Shinozaki és mtsai., 2015), HSFA4A multimerek, más hőszokk faktorok és a transzportot segítő fehérjék lehetnek (Scharf és mtsai., 1998; Baniwal és mtsai., 2007).

Elmondható, hogy a HSFA4A transzkripciós faktor nem csak a kései, de a korai, gyors stresszválaszban is fontos szerepet játszik. Valószínűsíthető, hogy bizonyos stresszkörülmények, mint a hő és sóstressz, más jelátviteli utakon szabályozzák a *HSFA4A* gén transzkripcióját, illetve kombinált stressz során az egyik jelátviteli út által létrehozott válasz felülírhatja vagy befolyásolhatja a másikat. Ezenkívül kimutattuk a HSFA4A fehérje gyors,

stressz-indukált sejtmagi lokalizációját, illetve azt, hogy a sejtek redox állapota hatással lehet a HSFA4A és más fehérjék közötti kölcsönhatásokra, amely befolyásolhatja aktivitását.

5.2. A HSFA4A transzkripció faktor része a MAP kináz jelátviteli útnak

A reaktív oxigén származékok fontos szerepet töltenek be a növények életében, melyek természetes körülmények között is jelen vannak, azonban stressz során felhalmozódásuk fokozódik és oxidatív károsodást eredményeznek (Apel és Hirt, 2004; Choudhury és mtsai., 2017). A növények a megfelelő ROS egyensúly létrehozásával és fenntartásával próbálják kiküszöbölni a károsító hatásokat, melyhez speciális méregtelenítési rendszert hoztak létre (Miller és mtsai., 2010). A ROS-ok azonban sokszor elengedhetetlenek a megfelelő jelátvitel és sejtválasz kialakításában, mint ahogy az a MAPK kaszkádon keresztüli sejtválaszban is megfigyelhető (Shinozaki és mtsai., 2015). *Arabidopsis*-ban a hidrogén-peroxid másodlagos hírvivőként képes aktiválni a két legfontosabb MAPK kaszkádon alapuló jelátviteli utat, az MKK4/5 – MPK3/6 és MKK1/2 – MPK4 utakat (Nakagami és mtsai., 2006; Colcombet és Hirt, 2008; Smékalová és mtsai., 2013). Korábban már kimutattuk, hogy a HSFA4A foszforilációs célpontja az MPK3 és MPK6 kinázoknak, melyek elsősorban a Ser309-et foszforilálják (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). Újabb foszforilációs kísérletekkel sikeresen kimutattuk, hogy az MPK4 kináz is több aminosav csoporton képes foszforilálni a HSFA4A fehérjét, melyek közül, hasonlóképpen, mint az MPK3/6 esetében, a Ser309-es foszforilációs hely lehet a legfontosabb. A mostani és a korábbi eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a ROS indukált és MAP kináz kaszkád által közvetített jelet a HSFA4A képes továbbítani az MPK3/4/6 kinázok általi foszforiláció segítségével. Rayapuram és mtsai., (2018) nemrég kimutatták, hogy a fent említett három MPK kináz szubsztrát specificitása a célfehérjén található, meghatározott aminosav kombinációból, (Ser/Thr)Pro (Ser – szerin, Thr – treonin, Pro – prolin), adódik. A Ser198, Ser239 és Ser309 környezetében megtalálható az ilyen szekvencia kombináció. Az általunk azonosított foszforilációs helyek konzerváltak a *Brassicaceae* családban található HSFA4-típusú faktorokban is. A konzervált MAPK kihorgonyzó (Pitzschke, 2015; Dóczi és Bögre, 2018) és DNS-kötő régió, illetve a foszforilációs helyek bioinformatikai vizsgálata alapján elmondható, hogy a HSFA4-típusú transzkripció faktorok MAP kinázok általi foszforilációja evolúciósan konzervált a kétszikűekben. Érdekes, hogy ritkán fordul elő, hogy az MPK3/6 és az MPK4 kinázoknak ugyanazok a foszforilációs célpontjai (Leissing és mtsai., 2016; Dóczi és Bögre, 2018). Az MPK3 és MPK6 inkább pozitív szabályozója a stresszválasznak, míg az MPK4 esetében a negatív szabályozás is megfigyelhető (Pitzschke és mtsai., 2009).

Ugyanakkor adataink és Pérez-Salamó és mtsai. (2014) alapján elmondható, hogy a HSFA4A mindhárom MAP kináz célpontja lehet a stresszválasz során. Ezenkívül olyan foszforilációs helyeket is sikerült azonosítani az *in vivo* tesztek segítségével, melyek nem a MAP kinázok célpontjai, vagyis más csoportokba tartozó kinázok is foszforilálhatják a HSFA4A faktort és befolyásolhatják működését.

5.3. Az azonosított foszforilációs helyek lehetséges szerepei

Az *in vitro* és *in vivo* foszforilációs kísérletek során több olyan aminosavat sikerült azonosítani, melyek a HSFA4A konzervált régiói közelében helyezkednek el, ezáltal szerepük lehet ennek aktivitásában. Ezek, a szintén konzervált foszforilációs helyek a Ser112, Thr124, Ser198, Ser239 és Thr396, melyek vagy a DNS-kötő és oligomerizációs régió, a sejtmagi transzportban szerepet játszó régiók, vagy a MAPK kihorgonyzó hely közelében találhatóak. Pontos szerepüket a megfelelő kísérletek nélkül nehéz megmondani, ugyanakkor a növényi rendszerekben végzett kutatások inkább a foszforiláció hatását, mintsem a foszforilációs hely pontos helyét és annak szerepét vizsgálják. A DNS-kötő régió közelében történő foszforiláció hatása hasonlóképpen kevés irodalmi adattal rendelkezik. Reindl és mtsai. (1997) kimutatták, hogy a Ser csoportokon történő foszforiláció negatív hatással van az AtHSF1 DNS kötésére *in vitro*, de pontos foszforilációs helyet nem azonosítottak. Liu és mtsai. (2008) bizonyították, hogy az AtCBK foszforilációja fontos az AtHSFA1a hősokk elemekhez való kötődésben, azonban a foszforiláció pontos helyét itt sem azonosították. Azonban született néhány kutatás, melyben azonosították az adott foszforilációs hely szerepét. Evrard és mtsai. 2013-ban kimutatták, hogy az AtHSFA2 faktor nukleáris lokalizációs szignál közelében található Thr249 MPK6 általi foszforilációja pozitívan befolyásolja a sejtmagi transzportot. Humán, állat és élesztő rendszerekben több kutatás született a DNS-kötő régió közelében található foszforilációs helyek szerepéről (Hirata és mtsai. 1993; Desclozeaux és mtsai. 1998; Sopko és Stuart 2003; Nieto és mtsai. 2007), azonban ezek alapján nem lehet egyértelmű következtetést levonni. Ugyanakkor inkább az a jellemzőbb, hogy a DNS-kötő domén közeli Ser vagy más hely foszforilációja gátolja a DNS kötést, míg a távolabbi Ser vagy Thr helyeken történő foszforiláció serkenti a HSF-ok vagy más TF-ok működését.

5.4. A *HSFA4A* túltermelése javítja a növények stressz toleranciáját

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a *HSFA4A* túltermelése többféle stresszel szemben ellenállóbbá teszi az *Arabidopsis* növényeket, fokozva azok antioxidáns rendszerük működését, ezáltal csökkentve a ROS-ok általi oxidatív károsodás mértékét (Pérez-Salamó és mtsai., 2014), azonban a *HSFA4A* hatása kombinált stressz esetén nem volt ismert. Kísérleteink rámutattak, hogy a foszforilációnak is szerepe lehet a *HSFA4A* működésében, ezért a vad típus mellett, egy konstitutív foszforilációt mimikáló mutáns változatát is túltermeltettük ennek a transzkripciós faktornak *Arabidopsis* növényekben. Vizsgálataink során egyedi és kombinált só és hőstresszt alkalmaztunk, mivel a kombinált stressz előfordulása gyakoribb a természetben. Kimutattuk, hogy a vad és mutáns *HSFA4A* túltermelése képes nagyobb túlélést biztosítani a transzformáns növényeknek, illetve csökkenti azok oxidatív károsodásának mértékét, nemcsak egyedi, de kombinált só és hőstressz esetében is. A MAP kináz foszforilációnak legtöbb esetben nem volt drasztikus hatása az ellenállóképességre, de bizonyos stressz körülmények között befolyásolhatja az oxidatív károsodás mértékét. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *HSFA4A* fontos szerepet tölt be a kombinált stressz kivédésében is, elsősorban az oxidatív károsodás csökkentése révén. Más kutatások is hasonló eredményre jutottak. A *HSFA1b* túltermelése *Arabidopsis* és repce (*Brassica napus*) növényekben javította az abiotikus és biotikus stresszekkel szembeni ellenállóképességet, ami magasabb terméshozamot eredményezett (Prändl és mtsai., 1998; Bechtold és mtsai., 2013; Jung és mtsai., 2013). A repce *BcHSFA1* gént expresszáló transzgenikus dohány növényekben hő stressz hatására megemelkedett a hő-indukált gének expressziója és az antioxidáns enzimek aktivitása, ami a hőtolerancia javulását eredményezte (Zhu és mtsai., 2018). Egy másik közleményben leírták, hogy a *HSFA2*-t túltermelő *Arabidopsis* növények a termotolerancia mellett, só és ozmotikus stresszel szemben is ellenállóbbnak bizonyultak (Ogawa és mtsai., 2007; Yabuta, 2016).

Eredményeink és az irodalmi adatok alapján kijelenthetjük, hogy más hő sokk faktorokhoz hasonlóan a *HSFA4A* is fontos szerepet játszik a hő és más környezeti stressz kivédésében.

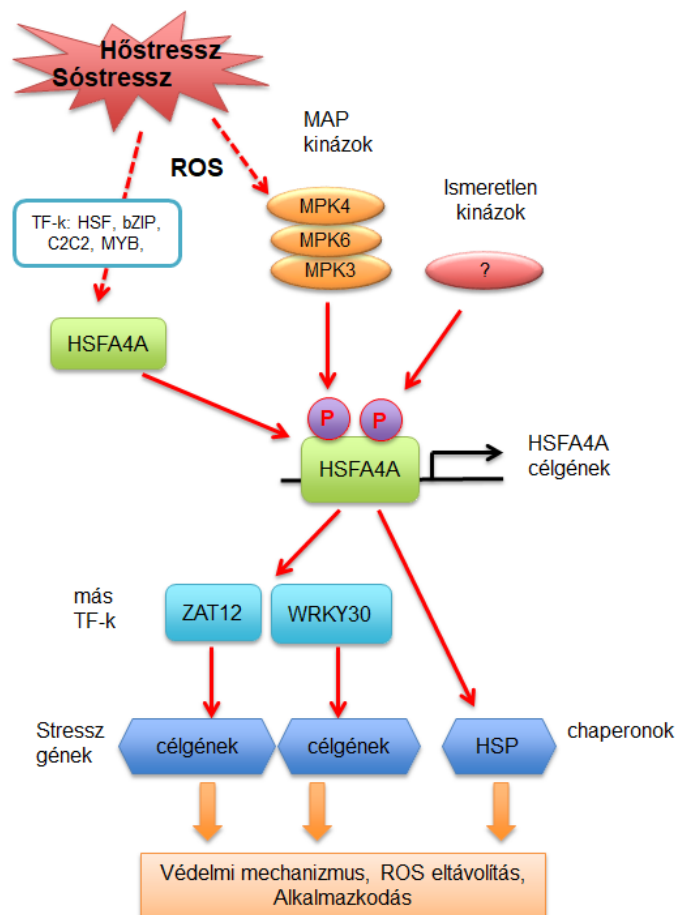
5.5. A *HSFA4A* egy fontos szabályozó egység a stresszválaszban

A *HSFA4*-típusú transzkripciós faktorokat több olyan stresszel hozták összefüggésbe (pl. só-, nehézfém- és szárazság), melyek megnövekedett ROS szintet és oxidatív károsodást eredményeznek (Shim és mtsai., 2009; Lang és mtsai., 2017; Li és mtsai., 2018). Pérez-Salamó és mtsai. (2014) korábban kimutatták, hogy a *HSFA4A* génexpressziója megemelkedik

hidrogén-peroxid hatására, illetve ennek a hősokk faktornak a túltermelése hatással van különböző ROS-indukált gének expressziójára, ezáltal mérsékelve az oxidatív stressz hatását. Eredményeink rámutattak, hogy a HSFA4A szervesen részt vesz a stresszválasz kialakításában és képes csökkenteni az oxidatív károsodást kombinált stressz esetében is. A sóstressz során megfigyeltük a HSFA4A gyors sejtmagi transzportját, mely arra enged következtetni, hogy ez a TF olyan célgénnek aktiválását eredményezi, melyeknek közvetett vagy közvetlen szerepe van a ROS-ok eltávolításában és a sejtkárosodás kivédésében. A közvetlen transzkripciós szabályozás lehetőségét olyan géneken vizsgáltuk, melyekről tudtuk, hogy génexpressziójuk megemelkedik a *HSFA4A* túltermelésének hatására (Pérez-Salamó és mtsai., 2014). Kromatin immunprecipitáció (ChIP) segítségével kimutattuk, hogy a HSFA4A transzkripciós faktor képes felismerni és kapcsolódni a *HSP17.6A*, *ZAT12* és *WRKY30* gének promoterében található hősokk elemekhez, és a kapcsolódás mértékét a só, hő és kombinált stresszkezelés befolyásolja. A *HSP17.6A* egy chaperon fehérje, mely nélkülözhetetlen a fehérjék károsodásának csökkentésében és megakadályozásában bizonyos stresszhatások során (Wang és mtsai., 2004). A *HSP17.6A* túltermelése *Arabidopsis*-ban növeli a só- és szárazságtűrést (Sun és mtsai., 2001) és a csírázó magokban csökkenti az ABA érzékenységet (Papdi és mtsai., 2008). A *ZAT12* transzkripciós faktor fontos szerepet tölt be a ROS jelátvitelben és elősegíti az *APX1* (aszorbát peroxidáz 1) gén transzkripcióját, mely elengedhetetlen a sejt redox egyensúlyának a kialakításában (Rizhsky és mtsai., 2004a; Davletova és mtsai., 2005a). A *ZAT12* faktor a FIT (Fer-típusú vashiány-indukált transzkripciós faktor) fehérje működése során keletkező hidrogén-peroxid érzékelésével csökkenti a vas felvételt (Le és mtsai., 2016). Paradicsom növényekben a *ZAT12* aktiválja a kis hősokk proteinek és antioxidáns enzimeket kódoló gének expresszióját és csökkenti a hőstressz által okozott oxidatív stressz hatását (Shah és mtsai., 2013). A *WRKY*-típusú transzkripciós faktorok főleg a patogén válasz kialakításában vesznek részt (Eulgem és mtsai., 2000). A *WRKY30* génexpresszióját a só és oxidatív stressz is indukálja, míg túltermelése megnövekedett abiotikus stressztoleranciát eredményez (Scarpeci és mtsai., 2013). Ezenkívül a *WRKY30* a szalicilsav jelátviteli úton keresztül szabályozza a levelek öregedését is (Besseau és mtsai., 2012), illetve rizsben a szalicilsav és jázmonsav hatására segíti a gombafertőzések elleni védelmet (Peng és mtsai., 2012). A *ZAT12* és *WRKY30* transzkripciós faktorok több jelátviteli útvonal működésében és stresszindukált gén aktivációjában is részt vesznek, ezáltal pedig képesek kialakítani egy széleskörű, HSFA4A által irányított stresszválaszt. Más hősokk faktorról, mint például a HSFA1b, is kimutatták, hogy közvetlenül szabályozza a környezeti stressz kivédésében, illetve a növekedésben és fejlődésben szerepet játszó géneket. A HSFA1b többek között a következő gének működését

szabályozza: *AGO1* (az argonauta 1), *AGL19* (agamous-szerű 19), *AP3* (apetala 3), *ZFP8* (cink-ujj protein 8), *CDC48* (sejt osztódás ciklus 48), *MYB77*, *bZIP28*, *WRKY22*, *HSFB2a*, *HSFB2b*, *PIN4* (Albihlal és mtsai., 2018). Cortijo és mtsai. (2017) megfigyelték, hogy a HSFA4A-hoz hasonlóan a HSFA1a faktor enyhe hőstressz során több transzkripciós faktor promotereéhez is kapcsolódhat, ezáltal egy TF kaszkádot aktiválhat. Az azonosított transzkripciós faktorok közül érdemes megemlíteni a stressz-érzékeny *bZIP28*, *RAP2.4* és *DREB2A*-t, illetve a HSFB2 és HSFA7 családba tartozó *HSFB2A/B*-t és *HSFA7A/B*-t (Cortijo és mtsai., 2017).

Eredményeinkre támaszkodva, összeségében elmondható, hogy a HSFA4A több összetett és bonyolult jelátviteli út része, melyben, mint egy szabályozó egység, képes összekötni a ROS, MAPK és más kinázok által közvetített jelet a stresszválasz kialakításában résztvevő transzkripciós faktorok és végrehajtó fehérjék népes táborával (21. Ábra).



21. Ábra. A HSFA4A által közvetített stressz-jelátvitel és a transzkripciós szabályozás feltételezett modellje. A környezeti stressz, mint például a só- vagy hőstressz reaktív oxigén származékokat generál, ami aktiválja a MAP kinázokat (MPK3/6 és MPK4). A stressz körülmények különböző transzkripciós faktoron keresztül (HSF, bZIP, MYB) indukálják a *HSFA4A* expresszióját. A MPK3/6, MPK4 és más kinázok foszforilálják a HSFA4A-t, így szabályozva annak aktivitását és ezáltal a célgének indukcióját. A HSFA4A promotor elemekhez (HSE) való kötődése olyan stressz-indukálható gének aktiválását eredményezi, melyek fontos szerepet töltenek be a stresszválaszban. Ilyenek a chaperonok (*HSP17.6A*) vagy más transzkripciós faktorok, mint a *ZAT12* és *WRKY30*, melyek közvetlenül vagy közvetve vesznek részt a stressztűrésben.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolának a lehetőségért, hogy elvégezhettem a doktori tanulmányaimat, illetve a Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak, hogy biztosította a támogatást és a helyszínt a munkám elvégzéséhez. Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Szabados Lászlónak és Dr. Rigó Gábornak a munkám során adott tudományos és szakmai tanácsokat, illetve Dr. Szabados Lászlónak, hogy lehetővé tette, hogy az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoportban dolgozhattam. Köszönöm Dr. Rigó Gábornak a pályakezdésem elején, és azóta is nyújtott segítséget és hasznos tanácsokat, melyek a megfelelő irányba tereltek munkám során. Köszönöm Dr. Ferhan Ayaydinnak a konfokális mikroszkópiában, illetve a Proteomikai Laboratórium munkatársainak a foszforiláció meghatározásában nyújtott segítséget. Ugyanakkor szeretném megköszönni a csoport minden tagjának a segítséget és támogatást, kiemelten Dr. Cséplő Ágnesnek, Dr. Zsigmond Laurának, Király Annamáriának és Balla Mariannak. Ezenkívül, szeretném megköszönni a családomnak, anyukámnak és bátyámnak a tanulmányaim során nyújtott támogatást.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szerető feleségemnek, Nagy Ágotának a sok türelmet, a támogatást és a bizalmat, nélküle nem jutottam volna el idáig.

A doktorim során végzett munkát a következő pályázatok támogatták: OTKA NN-110962, NKFI KH-129510 és GINOP 2.3.2-15-2016-00001.

7. Irodalomjegyzék

- Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 545-555.
- Albihlal WS, Obomighie I, Blein T, Persad R, Chernukhin I, Crespi M, Bechtold U, Mullineaux PM. (2018). *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b regulates multiple developmental genes under benign and stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 69, 2847-2862.
- Aleksza D, Horvath GV, Sandor G, Szabados L. (2017). Proline Accumulation Is Regulated by Transcription Factors Associated with Phosphate Starvation. *Plant Physiology* 175, 555-567.
- Al-Wahaibi MH. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science* 23, 139-150.
- Anckar J, Sistonen L. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annual Review of Biochemistry* 80, 1089-1115.
- Apel K, Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Asada K, Takahashi M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, 227-287.
- Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-396.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Baniwal SK, Chan KY, Scharf KD, Nover L. (2007). Role of Heat Stress Transcription Factor HsfA5 as Specific Repressor of HsfA4. *Journal of Biological Chemistry* 282, 6.
- Bartoli CG, Casalengué CA, Simontacchi M, Marquez-Garcia B, Foyer CH. (2013). Interactions between hormone and redox signaling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* 94, 73-88.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229-1240.

- Bechtold U, Albihlal WS, Lawson T, Fryer MJ, Sparrow PAC, Richard F, Persad R, Bowden L, Hickman R, Martin C, Beynon JM, Buchanan-Wollaston V, Baker NR, Morison JIL, Schöfl F, Ott S, Mullineaux PM. (2013). *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. *Journal of Experimental Botany* 64, 3467-3481.
- Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J. (2015). Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176, 192-201.
- Besseau S, Li J, Palva ET. (2012). WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 63, 2667-2679.
- Bigeard J, Hirt H. (2018). Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science* 9, 469.
- Bolt S, Zuther E, Zintl S, Hinch DK, Schmölling T. (2017). ERF105 is a transcription factor gene of *Arabidopsis thaliana* required for freezing tolerance and cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 40, 108-120.
- Busch W, Wunderlich M, Schoffl F. (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 41, 1-14.
- Carranco R, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Jordano J. (2017). SUMO-Dependent Synergism Involving Heat Shock Transcription Factors with Functions Linked to Seed Longevity and Desiccation Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 8, 974.
- Chauhan H, Khurana N, Agarwal P, Khurana P. (2011). Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* 286, 171-187.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 17, 1043-1054.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12, 444-451.
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal* 90, 856-867.
- Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK. (1996). Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3

- represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 271, 30847-30857.
- Clough SJ, Bent AF. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16(6), 735-43.
- Colcombet J, Hirt H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413, 217-226.
- Considine MJ, Foyer CH. (2014). Redox Regulation of Plant Development. *Antioxidants & Redox Signaling* 21/9.
- Cortijo S, Charoensawan V, Brestovitsky A, Buning R, Ravarani C, Rhodes D, van Noort J, Jaeger KE, Wigge PA. (2017). Transcriptional Regulation of the Ambient Temperature Response by H2A.Z Nucleosomes and HSF1 Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 10, 1258-1273.
- Csiszár J, Horváth E, Váry Z, Gallé Á, Bela K, Brunner S, Tari I. (2014). Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* 78, 15-26.
- Curtis MD, Grossniklaus U. (2003). A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* 133, 462-469.
- Czarnecka-Verner E, Pan S, Salem T, Gurley WB. (2004). Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Molecular Biology* 56, 57-75.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 5-17.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler N. (2005a). Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, 268-281.
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R. (2005b). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 847-856.
- Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Capony JP, Turowski P, Jay P, Méjean C, Moniot B, Boizet B, Berta P. (1998). Phosphorylation of an N-terminal Motif Enhances DNA-binding Activity of the Human SRY Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 273(14), 7988-7995.

- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57, 1697-1709.
- Dóczy R, Bögre L. (2018). The Quest for MAP Kinase Substrates: Gaining Momentum. *Trends in Plant Science* 23, 918-932.
- Dóczy R, Brader G, Pettko-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H. (2007). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* 19, 3266-3279.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5, 199-206.
- Evrard A, Kumar M, Lecourieux D, Lucks J, von Koskull-Döring P, Hirt H. (2013). Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* 1, e59.
- Fahad S, Hussain S, Matloob A, Khan FA, Khaliq A, Saud S, Hassan S, Shan D, Khan F, Ullah N, Faiq M, Khan MR, Tareen AK, Khan A, Ullah A, Ullah N, Huang J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation* 75, 391-404.
- Faragó D, Sass L, Valkai I, András N, Szabados L. (2018). PlantSize Offers an Affordable, Non-destructive Method to Measure Plant Size and Color in Vitro. *Frontiers in Plant Science* 9, 219.
- Ficarro SB, Adelmant G, Tomar MN, Zhang Y, Cheng VJ, Marto JA. (2009). Magnetic bead processor for rapid evaluation and optimization of parameters for phosphopeptide enrichment. *Analytical Chemistry* 81, 4566-4575.
- Furuya T, Matsuoka D, Nanmori T. (2014). Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 588, 2025-2030.
- Garg N, Manchanda G. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 595-618.
- Georgii E, Jin M, Zhao J, Kanawati B, Schmitt-Kopplin P, Albert A, Winkler JB, Schaffner AR. (2017). Relationships between drought, heat and air humidity responses revealed by transcriptome-metabolome co-analysis. *BMC Plant Biology* 17, 120.

- Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. (2006). Smallest Angiosperm Genomes Found in *Lentibulariaceae*, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biology*, 8, 770-777.
- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehltling J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE. (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* 11, 192-198.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. (1998). Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50, 413-434.
- Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3, 11.
- Hashikawa N, Sakurai H. 2004. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Molecular Cell Biology* 24, 3648-3659.
- Heerklotz D, Doring P, Bonzelius F, Winkelhaus S, Nover L. (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Molecular Cell Biology* 21, 1759-1768.
- Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Molecular Cell Biology* 23, 2953-2968.
- Hirata Y, Kiuchi K, Chen HC, Milbrandt J, Guroff G. (1993). The Phosphorylation and DNA Binding of the DNA-binding Domain of the Orphan Nuclear Receptor NGFI-B. *The Journal of Biological Chemistry* 268(33), 24808-24812.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604-611.
- Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, Hellman J, Morrice N, MacKintosh C, Morimoto RI, Eriksson JE, Sistonen L. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO Journal* 20, 3800-3810.

- Horvath BM, Kourova H, Nagy S, Németh E, Magyar Z, Papdi C, Ahmad Z, Sanchez-Perez GF, Perilli S, Blilou I, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Mészáros T, Binarova P, Bögre L, Scheres B. (2017). Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO Journal* 36, 1261-1278.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Krei M, Zhang SQ, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7, 301-308.
- Jung H-S, Crisp PA, Estavillo GM, Cole B, Hong F, Mockler TD, Pogson BJ, Chory J. (2013). Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110, 14474-14479.
- Kader MA, Lindberg S. (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling and Behavior* 5, 233-238.
- Kim JM, Sasaki T, Ueda M, Sako K, Seki M. (2015). Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Frontiers in Plant Science* 6, 114.
- Kim SA, Yoon JH, Lee SH, Ahn SG. (2005). Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12653-12657.
- Koncz, C., Chua, N.H., and Schell, J. (1992). *Methods in Arabidopsis research* pp. 482.
- Koncz, C., Dejong, F., Villacorta, N., Szakonyi, D., and Koncz, Z. (2012). The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Frontiers in Plant Science* 3, 9.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J. (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, vol. B2, pp. 1-22. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS USA* 97, 2940-2945.
- Lang S, Liu X, Xue H, Li X, Wang X. (2017). Functional characterization of BnHSFA4a as a heat shock transcription factor in controlling the re-establishment of desiccation tolerance in seeds. *Journal of Experimental Botany* 68, 2361-2375.

- Larkindale J, Huang B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology* 161, 405-413.
- Larkindale J, Knight MR. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128, 682-695.
- Le CT, Brumbarova T, Ivanov R, Stoof C, Weber E, Mohrbacher J, Fink-Straube C, Bauer P. (2016). Zinc Finger of *Arabidopsis thaliana* 12 (ZAT12) Interacts with Fer-Like Iron Deficiency-Induced Transcription Factor (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses. *Plant Physiology* 170, 540-557.
- Lee HG, Seo PJ. (2015). The MYB96-HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF-COR pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 82, 962-977.
- Lee JH, Yun H, Kwon C. (2012). Molecular communications between plant heat shock responses and disease resistance. *Molecules and Cells* 34, 109-116.
- Lee S, Lee EJ, Yang EJ, Lee JF, Park AR, Song WH, Park OK. (2004). Proteomic Identification of Annexins, Calcium-Dependent Membrane Binding Proteins That Mediate Osmotic Stress and Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 1378-1391.
- Leissing F, Nomoto M, Bocola M, Schwaneberg U, Tada Y, Conrath U, Beckers GJ. (2016). Substrate thiophosphorylation by *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases. *BMC Plant Biology* 16, 48.
- Li F, Zhang H, Zhao H, Gao T, Song A, Jiang J, Chen F, Chen S. (2018). Chrysanthemum CmHSFA4 gene positively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1311-1321.
- Li G, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S. (2012a). Dual-Level Regulation of ACC Synthase Activity by MPK3/MPK6 Cascade and Its Downstream WRKY Transcription Factor during Ethylene Induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 8, e1002767.
- Li H, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Zhang S, Gong Z, Yang S. (2017). MPK3- and MPK6-Mediated ICE1 Phosphorylation Negatively Regulates ICE1 Stability and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 43, 630-642 e634.
- Li Z, Yue H, Xing D. (2012b). MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 195, 85-96.

- Lin KF, Tsai MY, Lu CA, Wu SJ, Yeh CH. (2018). The roles of Arabidopsis HSFA2, HSFA4a, and HSFA7a in the heat shock response and cytosolic protein response. *Botanical Studies* 59, 15.
- Link V, Sinha AK, Vashista P, Hofmann MG, Proels RK, Ehness R, Roitsch T. (2002). A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. *FEBS Letters* 531, 179-183.
- Liu HT, Gao F, Li GL, Han JL, Liu DL, Sun DY, Zhou RG. (2008). The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55, 760-773.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10, 1391-1406.
- Lumbreras V, Vilela B, Irar S, Sole M, Capellades M, Valls M, Coca M, Pages M. (2010). MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal* 63, 1017-1030.
- Mahajan S, Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S. (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1639-1653.
- Masood A, Shah NA, Zeeshan M, Abraham G. (2006). Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *Environmental and Experimental Botany* 58, 216-222.
- Mathur J, Koncz C, Szabados L. (1995). A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Reports* 14, 221-226.
- Meng X, Xu J, He Y, Yang KY, Mordorski B, Liu Y, Zhang S. (2013). Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell* 25, 1126-1142.
- Meyerowitz EM. (1992). Introduction to the *Arabidopsis* genome. In *Methods in Arabidopsis Research*. eds. Koncz C, Chua NH, Schell J, World Scientific, Singapore, 100-118.

- Miller G, Mittler R. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Annals of Botany* 98, 279-288.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33, 453-467.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452, 55-68.
- Mittler R, Blumwald E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61, 443-462.
- Mittler R, Blumwald E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* 27, 64-70.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16, 300-309.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9, 405-410.
- Mizoi J, Kanazawa N, Kidokoro S, Takahashi F, Qin F, Morimoto K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2019). Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 294, 902-917.
- Munns R, Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends in Plant Science* 10, 339-346.
- Nakagami H, Soukupova H, Schikora A, Zarsky V, Hirt H. (2006). A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 38697-38704.
- Nguyen HM, Sako K, Matsui A, Suzuki Y, Mostofa MG, Ha CV, Tanaka M, Tran L-SP, Habu Y, Seki M. (2017). Ethanol Enhances High-Salinity Stress Tolerance by Detoxifying Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* and Rice. *Frontiers in Plant Science* 8,1001.

- Nguyen XC, Hoang MH, Kim HS, Lee K, Liu XM, Kim SH, Bahk S, Park HC, Chung WS. (2012a). Phosphorylation of the transcriptional regulator MYB44 by mitogen activated protein kinase regulates *Arabidopsis* seed germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423, 703-708.
- Nguyen XC, Kim SH, Lee K, Kim KE, Liu NM, Han HJ, Hoang MHT, Lee SW, Hong JC, Moon YH, Chung WS. (2012b). Identification of a C2H2-type zinc finger transcription factor (ZAT10) from *Arabidopsis* as a substrate of MAP kinase. *Plant Cell Reports* 31, 737-745.
- Nieto L, Joseph G, Stella A, Henri P, Burlet-Schiltz O, Bernard Monsarrat², Clottes E, Erard M. (2007). Differential Effects of Phosphorylation on DNA Binding Properties of N Oct-3 Are Dictated by Protein/DNA Complex Structures. *Journal of Molecular Biology* 370, 687-700.
- Nover L, Bharti K, Doring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6, 177-189.
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T. (2007). High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany* 58, 3373-3383.
- Ohama N, Kusakabe K, Mizoi J, Zhao H, Kidokoro S, Koizumi S, Takahashi F, Ishida T, Yanagisawa S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2016). The Transcriptional Cascade in the Heat Stress Response of *Arabidopsis* Is Strictly Regulated at the Level of Transcription Factor Expression. *The Plant Cell* 28, 181-201.
- O'Malley RC, Huang SC, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, Galli M, Gallavotti A, Ecker JR. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 166, 1598.
- Opdenakker K, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. (2012). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases in Plant Metal Stress: Regulation and Responses in Comparison to Other Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Science* 13, 7828-7853.
- Papdi C, Abraham E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L. (2008). Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiology* 147, 528-542.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4056-4075.

- Park CJ, Seo YS. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathology Journal* 31(4), 323-333.
- Peng X, Hu Y, Tang X, Zhou P, Deng X, Wang H, Guo Z. (2012). Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta* 236, 1485-1498.
- Pérez-Salamó I, Papdi C, Rigó G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horváth B, Domoki M, Darula Z, Medzihradzky K, Bögre L, Koncz C, Szabados L. (2014). The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiology* 165, 319-334.
- Pérez-Salamó I. (2014). Functional characterization of the *Arabidopsis* heat shock factor A4A, identified by a novel genetic screen. *Doktori dolgozat*.
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H. (2009). A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signaling. *Molecular Plant* 2, 120-137.
- Pitzschke A. (2015). Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* 20, 49-55.
- Prändl R, Hinderhofer K, Eggers-Schumacher G, Schöffl F. (1998). HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 258, 269-278.
- Prochazkova D, Wilhelmova N. (2007). Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologiae Plantarum* 51, 401-406.
- Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J. (2012). MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Frontiers in Plant Science* 3, 169.
- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC, Bressendorff S, Friis P, Costantino P, Bones AM, Nielsen HB, Mundy J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161, 1783-1794.
- Rayapuram N, Bigeard J, Alhoraibi H, Bonhomme L, Hesse AM, Vinh J, Hirt H, Pflieger D. (2018). Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6. *Molecular and Cellular Proteomics* 17, 61-80.
- Reindl A, Schöffl F, Schell J, Koncz C, Bako L. (1997). Phosphorylation by a cyclin-dependent kinase modulates DNA binding of the *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HSF1 *in vitro*. *Plant Physiology* 115, 93-100.

- Rivero RM, Mestre TC, Mittler R, Rubio F, Garcia-Sanchez F, Martinez V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell and Environment* 37, 1059-1073.
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R. (2004a). The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11736-11743.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. (2004b). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134, 1683-1696.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292-1309.
- Samuel MA, Miles GP, Ellis BE. (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant Journal* 22, 367-376.
- Scarpeci TE, Zanon MI, Carrillo N, Mueller-Roeber B, Valle EM (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology* 66, 361-378.
- Scarpeci TE, Zanon MI, Mueller-Roeber B, Valle EM. (2013). Overexpression of AtWRKY30 enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 83, 265-277.
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819, 104-119.
- Scharf KD, Heider H, Hohfeld I, Lyck R, Schmidt E, Nover L. (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Molecular Cell Biology* 18, 2240-2251.
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 194-199.
- Sewelam N, Oshima Y, Mitsuda N, Ohme-Takagi M. (2014). A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study. *Plant, Cell and Environment* 37, 2024-2035.
- Shah K, Singh M, Rai AC. (2013). Effect of heat-shock induced oxidative stress is suppressed in BcZAT12 expressing drought tolerant tomato. *Phytochemistry* 95, 109-117.

- Shim D, Hwang JU, Lee J, Lee S, Choi Y, An G, Martinoia E, Lee Y. (2009). Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* 21, 4031-4043.
- Shinozaki K, Uemura M, Bailey-Serres J, Bray EA, Weretilnyk E. (2015). Responses to abiotic stress. In.: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Wiley Blackwell by John Wiley & Sons, Ltd., pp. 1051-1100.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217-223.
- Simon T. (1994). A magyarországi edényes flóra határozója (Harasztok-Virágos növények)
- Singh KK. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* SLN1P-SSK1P two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radical Biology & Medicine* 29(10), 1043-1050.
- Smékalová V, Duskocilova A, Komis G, Samaj J. (2013). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32, 2-11.
- Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Kido EA, Pandolfi V, Marcelino-Guimaraes FC, Rodrigues FA, Pereira GA, Benko-Iseppon AM. (2012). Overall picture of expressed Heat Shock Factors in *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Genetics and Molecular Biology* 35, 247-259.
- Sopko R and Stuart DT. (2004). Purification and characterization of the DNA binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* meiosis-specific transcription factor Ndt80 Protein. *Expression and Purification* 33, 134-144.
- Su J, Zhang M, Zhang L, Sun T, Liu Y, Lukowitz W, Xu J, Zhang S. (2017). Regulation of Stomatal Immunity by Interdependent Functions of a Pathogen-Responsive MPK3/MPK6 Cascade and Abscisic Acid. *Plant Cell* 29, 526-542.
- Sun T, Nitta Y, Zhang Q, Wu D, Tian H, Lee JS, Zhang Y. (2018). Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Reports* 19.
- Sun W, Bernard C, van de Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N. (2001). At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant Journal* 27, 407-415.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203, 32-43.

- Szabolcs I. (1974). Salt affected soils in Europe. Martinus Nijhoff, *The Hague*, 63p.
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. (2015). *Plant Physiology and Development, Sixth Edition*. Abiotic stress. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. ISBN 978-1-60535-255-8
- Taiz L, Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Response and Adaptation to Abiotic Stress. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. ISBN 978-0-87893-866-7
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15, 141-152.
- Torres MA, Dangl JL. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 397-403.
- Volkov RA, Panchuk, II, Mullineaux PM, Schoffl F. (2006). Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 61, 733-746.
- von Koskull-Döring P, Scharf KD, Nover L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* 12, 452-457.
- Vysotskaya LB, Veselov SY, Kudoyarova GR. (2010). Effect on shoot water relations, and cytokinin and abscisic acid levels of inducing expression of a gene coding for isopentenyl transferase in roots of transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 613, 709-3717.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244-252.
- Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ, Zhong R, Gaestel M, Calderwood SK. (2006). Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *Journal of Biological Chemistry* 281, 782-791.
- Wang Z, Lindquist S. (1998). Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in *Drosophila* embryos enable the heat shock response. *Development* 125, 4841-4850.
- Xin Z, Browse J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell & Environment* 23, 893-902.

- Xu J, Zhang S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20, 56-64.
- Yabuta Y. (2016). Functions of heat shock transcription factors involved in response to photooxidative stresses in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(7), 1254-1263.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Fuminori Takahashi F, Shinozaki K. (2006). The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscisic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 5310-5318.
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 38, 35-49.
- Zhu X, Huang C, Zhang L, Liu H, Yu J, Hu Z, Hua W. (2017). Systematic Analysis of Hsf Family Genes in the *Brassica napus* Genome Reveals Novel Responses to Heat, Drought and High CO₂ Stresses. *Frontiers in Plant Science* 8, 1174.
- Zhu X, Wang Y, Liu Y, Zhou W, Yan B, Yang J, Shen Y. (2018). Overexpression of BcHsfA1 transcription factor from *Brassica campestris* improved heat tolerance of transgenic tobacco. *PLoS ONE* 13(11).
- Zsigmond L, Szepesi A, Tari I, Rigó G, Király A, Szabados L. (2012). Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Science* 182, 87-93.

8. Összefoglaló

A természetben, a gyakran egyidejűleg ható környezeti hatások megnehezítik a helyhez kötött növények növekedését, fejlődését és szaporodását. Az evolúció során a növények olyan összetett szabályozáson alapuló mechanizmust fejlesztettek ki, mellyel akár a legextrémebb környezethez is képesek alkalmazkodni és túlélni azok káros hatásait. A káros környezeti hatások kivédésére több stressz-indukált jelátviteli út aktiválódik, melyek összehangolt működése révén kialakul a stresszválasz, ami a növények alkalmazkodását eredményezi. A stresszválaszt kialakító jelátviteli utak több elemből állnak, melyekben megtaláljuk a növényi hormonokat, receptorokat, kinázokat, transzkripciós faktorokat és a stressz során keletkező reaktív oxigén származékokat is. A transzkripciós faktorok között fontos szerep jut a hőszokk faktoroknak (HSF), melyek inaktív formában a citoplazmában lokalizálódnak, majd stressz hatására aktiválódnak és a sejtmagba jutva fejtik ki hatásukat a génexpresszióra. A növényekben a hőszokk faktorok, többféle jelátviteli rendszer komponenseiként, részt vesznek a hő, só, szárazság, nehézfém, illetve oxidatív stressz során fellépő válasz szabályozásában. A stressz során a hőszokk faktorok szabályozzák a stressz-indukált gének aktiválódását, azáltal, hogy a célgén promoterén található hőszokk elemekhez kapcsolódnak. Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a hőszokk faktorok részt vesznek az egyedi stressztípusok során fellépő válaszok kialakításában, azonban kombinált stresszben betöltött szerepük kevésbé ismert. Korábban már kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* HSFA4A szabályozza a só és oxidatív stresszválaszt, illetve, hogy a MPK3/6 kinázok foszforilálják, és a Ser309 aminosav a domináns foszforilációs hely. Munkám során folytattam a HSFA4A transzkripciós faktor jellemzését, hogy felderítsük szerepét a kombinált stresszben és az általa szabályozott stressz-jelátviteli útvonalakban.

Génexpressziós és Western blot kísérletek segítségével sikerült kimutatni, hogy a *HSFA4A* nem csak hő- és sóstressz, de kombinált hő és só stressz hatására is aktiválódik, illetve a fehérje mennyiségi változása összhangban van a gén indukciójával. Mikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy sókezelés hatására a YFP-jelölt HSFA4A mennyisége húsz percen belül megnövekszik a gyökérsejtek sejtmagjában, illetve két órás kezelés után sokkal erősebb fluoreszcencia figyelhető meg a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a hatásoktól függően a HSFA4A egyaránt részt vesz a korai és kései stresszválaszban is.

A hőszokk faktorok több poszt-transzlációs módosításon mennek keresztül, mint például a foszforiláció vagy szumoiláció, melyek meghatározzák a HSF működését. Az MPK3/6

mellett az MPK4 kináz is foszforilálja a HSFA4A transzkripció faktorát, illetve e kináz esetében is a Ser309-es aminosav bizonyult az elsődleges foszforilációs helynek. *In vivo* kísérletekkel is sikerült kimutatni a MAP kinázok által *in vitro* körülmények között preferált aminosav csoportok foszforilációját, ugyanakkor olyan foszforilációs helyeket is azonosítottunk, melyek más kináz családok célpontjai lehetnek. Az adatok arra utalnak, hogy a HSFA4A egy összetett foszforilációs szabályozáson megy keresztül, melyben a MAP kinázokon kívül egyéb kinázok is részt vesznek.

A multimerizáció elengedhetetlen a HSF-ok működéséhez, hiszen trimereket alkotva válnak aktívvá és látják el transzkripció funkciójukat a sejtmagban. A foszforiláció hatását a HSFA4A dimerizációra bimolekuláris fluoreszcens komplementációval (BiFC) vizsgáltuk. A kísérletekben egy pozitív, illetve egy negatív foszforilációs mutánst és vad típusú HSFA4A-t juttattunk *Arabidopsis* protoplastokba, majd fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk a transzformált sejteket. A foszforilációs mutások létrehozásához a Ser309-es aminosavat cseréltük alaninra (nem foszforiláló, negatív foszforilációs mutáns), illetve aszpartátra (foszforilációt imitáló, pozitív foszforilációs mutáns). Sikerült kimutatni, hogy a foszforiláció segíti a dimerizációt, de nem abszolút szükséges a létrejöttéhez. A foszforiláció szerepe mellett sikerült kimutatni azt is, hogy a sejtek redox állapota hatással lehet a multimerizációra, illetve más fehérjékkel történő kölcsönhatásokra *in vitro*, mely szintén alátámaszthatja azt a megfigyelést, miszerint a HSFA4A működését az oxidatív stressz is befolyásolhatja (Pérez-Salamó és mtsai., 2014).

A vad típusú és a pozitív foszforilációs mutáns *HSFA4A* túltermelése *Arabidopsis* növényekben kedvező hatással van a növények túlélésére, illetve mérsékeli a lipidperoxidáció mértékét só-, hő- és kombinált stressz során. Kísérletünk alapján elmondhatjuk, hogy mindkét *HSFA4A* változat képes növelni a stressztűrést az oxidatív károsodás csökkentésével, illetve a Ser309 foszforilációnak kedvezőbb hatása lehet a tolerancia kialakulására.

Pérez-Salamó és mtsai., (2014) kimutatták, hogy a HSFA4A túltermelése hatással van több stressz-indukált gén expressziójára, ugyanakkor most sikerült bizonyítani, hogy stressz hatására a HSFA4A mennyisége megnövekszik a sejtmagban. A hő sokk faktorok transzkripció aktivitásukat és az említett eredményeket figyelembe véve, kromatin immunprecipitáció (ChIP) technikát használva, megvizsgáltuk néhány gén közvetlen kapcsolatát a HSFA4A transzkripció faktorral. Kimutattuk, hogy a HSFA4A képes felismerni és megkötni a *ZAT12* és *WRKY30* transzkripció faktor gének és a *HSP17.6A* kis hő sokk proteint kódoló gén promotereiben található hő sokk elemeket, és a promotor kötés só-, hő- és kombinált stressz hatására emelkedett. A *ZAT12* és *WRKY30* transzkripció faktorok és a *HSP17.6A* hő sokk

protein is fontos szerepet töltenek be a stressz káros hatásainak kivédésében, melyek működését a HSFA4A közvetlenül képes szabályozni.

Eredményeink alapján, összességében elmondható, hogy a HSFA4A transzkripciós faktor összekapcsolja és szabályozza a stresszválasz kialakításában részt vevő jelátviteli út elemeit.

9. Summary

In nature, simultaneously acting environmental stress factors have deleterious impact on plant growth, development and reproduction. During evolution, plants developed some complex mechanisms, which can help the adaptation and survival in extreme conditions. To cope with biotic and abiotic stresses, plants can activate several stress-induced signaling pathways and develop the most suitable stress response for acclimatization. These signaling pathways consists of many components, like plant hormones, receptors, kinases, transcription factors and even reactive oxygen species formed during stress. Heat shock factors (HSFs), as members of such signaling mechanisms, are involved in stress response establishment, including heat, salt, drought and heavy metal stresses. In active form, HSFs are localized in nucleus, where they can induce the expression of stress-related genes, through recognition of and binding to heat shock elements (HSEs) found in the promoters of target genes. Their role in individual stresses are relatively well studied, but their function in stress combination is not known. Earlier, we showed that *Arabidopsis* heat shock factor A4A (HSFA4A) regulates responses to salt and oxidative stresses, and is phosphorylated by MAP kinases MPK3 and MPK6, while the dominant phosphorylation site was the Ser309 residue. In this work, I continued the characterization of HSFA4A to elucidate its role in combined stress and stress signaling pathway.

We showed that *HSFA4A* is activated not only by heat and salt, but also by combined heat and salt stress, and changes in protein abundance is correlating with endogenous gene induction. Microscopic studies, confirmed a fast accumulation of YFP-tagged HSFA4A in root cell nuclei during salt stress, while in case of longer stress the fluorescence signal was higher in both cytoplasm and nucleus. Considering these results, we concluded, that HSFA4A is part of early and late stress responses in stress dependent manner.

Heat shock factors are subjects of different posttranslational modifications, like phosphorylation and sumoylation, which are necessary for proper regulation and function. We showed that, beside MPK3/6, HSFA4A is phosphorylated by MPK4 kinase and the dominant phosphorylation site is the Ser309 for all these kinases. *In vivo* phosphorylation assays revealed

that the same amino acid residues are phosphorylated *in vitro* and *in vivo*. We also identified phosphorylation sites, which can be targets of other kinase families. Our results suggest, that HSFA4A has a complex regulation, involving MAP kinases and other kinase families too.

To accomplish its transcription activation role, HSFs has to form homotrimers, therefore the capability of multimerization is essential. To test the effect of phosphorylation on HSFA4A dimerization we used bimolecular fluorescence complementation (BiFC). For this purpose, we transformed positive and negative phosphorylation mutant and wild type version of HSFA4A in *Arabidopsis* protoplast cells and fluorescence was monitored by fluorescence microscopic studies. To generate the phosphorylation mutants, we changed the Ser309 amino acid to alanin (lack of phosphorylation, negative phosphorylation mutant) or aspartate (mimic of phosphorylation, positive phosphorylation mutant). Phosphorylation seems to have positive effect on dimerization, but is not essential. Beside the role of phosphorylation, we showed that redox status of the cells also affects multimerization and/or interactions with other proteins *in vitro*. Oxidative stress may therefore influence the HSFA4A function as suggested before (Pérez-Salamó et al., 2014).

Overexpression of wild type and phosphorylation mimicking mutant version of *HSFA4A* in *Arabidopsis* plants has favorable effect on plant survival during salt, heat and combined stresses and can reduce lipid peroxidation in these conditions. In transgenic plants all versions of *HSFA4A* could enhance the stress tolerance by reducing the oxidative damages. Ser309 phosphorylation has no or only minimal effect on stress tolerance.

Pérez-Salamó et al., (2014) showed that overexpression of HSFA4A can influence the expression of a range of stress-induced genes. Here, we showed that the amount of HSFA4A protein increases in nuclei during stress. Considering that HSFs has transcriptional activity and the above mentioned results, we checked the promoter binding of HSFA4A, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. We revealed that HSFA4A can recognize and bind HSEs on promoter of *ZAT12* and *WRKY30* transcription factors and *HSP17.6A* small heat shock protein during salt, heat and combined stress. Both transcription factor and the heat shock protein are involved in stress response, and seems that HSFA4A directly regulates their function.

All together, we can say that HSFA4A transcription factor regulates multiple stress signaling pathways. HSFA4A connects stress-derived ROS signals, mediated by particular MAP kinases and promotes transcription of a set of target genes, including other classes of transcription factors or proteins with protective functions.

10. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10053161

A dolgozat alapját képező publikáció

Andrási N, Rigó G, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Papdi C, Klement E, Pettkó-Szandtner A, Baba AI, Ayaydin F, Dasari R, Cséplő Á, Szabados L. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Journal of Experimental Botany* *erz217*. IF: 5.36

Egyéb publikációk

Baba AI, **Andrási N**, Valkai I, Gorcsa T, Koczka L, Darula Z, Medzihradzsky KF, Szabados L, Fehér A, Rigó G, Cséplő Á. (2019). AtCRK5 Protein Kinase Exhibits a Regulatory Role in Hypocotyl Hook Development during Skotomorphogenesis. *International Journal of Molecular Science* *20*, 3432. IF: 4.183

Baba AI, Rigó G, **Andrási N**, Tietz O, Palme K, Szabados L, Cséplő Á. (2019). Striving Towards Abiotic Stresses: Role of the Plant CDPK Superfamily Members. In: Palocz-Andresen M, Szalay D, Gosztom A, Sípos L, Taligás T. (eds) *International Climate Protection*. Springer, Cham.

Baba AI, Rigó G, Ayaydin F, Rehman AU, **Andrási N**, Zsigmond L, Valkai I, Urbancsok J, Vass I, Pasternak T, Palme K, Szabados L, Cséplő Á. (2018). Functional Analysis of the *Arabidopsis thaliana* CDPK-Related Kinase Family: AtCRK1 Regulates Responses to Continuous Light. *International Journal of Molecular Science* *19*, 1282. IF: 4.183

Faragó D, Sass L, Valkai I, **Andrási N**, Szabados L. (2018). PlantSize Offers an Affordable, Non-destructive Method to Measure Plant Size and Color in Vitro. *Frontiers in Plant Science* *9*, 219. IF: 4.106

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős és/vagy első szerzője igazolom, hogy Andrási Norbert Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

Andrási N, Rigó G, Zsigmond L, Pérez-Salamó I, Papdi C, Klement E, Pettkó-Szandtner A, Baba AI, Ayaydin F, Dasari R, Cséplő Á, Szabados L. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Journal of Experimental Botany* *erz217*.

Szeged, 2019. szeptember 10.

Dr. Szabados László
Tudományos tanácsadó
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Baba AI, **Andrási N**, Valkai I, Gorcsa T, Koczka L, Darula Z, Medzihradsky KF, Szabados L, Fehér A, Rigó G, Cséplő Á. (2019). AtCRK5 Protein Kinase Exhibits a Regulatory Role in Hypocotyl Hook Development during Skotomorphogenesis. *International Journal of Molecular Science* *20*, 3432.

Szeged, 2019. szeptember 10.

Abu Imran Baba
Tudományos segédmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Dr. Cséplő Ágnes
Tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

11. Függelék

F1. Táblázat. A kísérletek során használt primerek listája.

Kód	5' - 3' Szekvencia	Felhasználás	Referencia
HsfA4A-qF	CTTTGAACCTATCGCCGTGT	HSFA4A (AT4G18880) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
HsfA4A-qR	TGTGTGTGAAGAAGGGCTTG	HSFA4A (AT4G18880) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
ZAT12-qF	GACGCTTTGTCGTCTGGATT	Zat12 (AT5G59820) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
ZAT12-qR	GTGTCCTCCCAAAGCTTGTC	Zat12 (AT5G59820) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
WRKY30-qF	AGAGCGATGATTCCGATCAAG	WRKY30 (AT5G24110) qRT-PCR	Besseau és mtsai., 2012
WRKY30-qR	CATCGTCCAGCGTTCTATCAA	WRKY30 (AT5G24110) qRT-PCR	Besseau és mtsai., 2012
Hsp17.6A-qF	CCAAAGAAAAAGCCAAGAAGC	Hsp17.6A (AT5G12030) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
Hsp17.6A-qR	TGGAAACCTTCCAAACTCCA	Hsp17.6A (AT5G12030) qRT-PCR	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
ER8A	GCTTGGGCTGCAGGTCGAGGCTAA	Inszeretek amplifikálása a pER8 vektorban	Papdi és mtsai., 2008
ER8B	CTGGTGTGTGGGCAATGAAACTGA TGC	Inszeretek amplifikálása a pER8 vektorban	Papdi és mtsai., 2008
GAPDH2_qF	AATGGAAAATTGACCGGAATGT	GAPDH2 (AT1G13440) qRT-PCR	Papdi és mtsai., 2008
GAPDH2_qR	CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA	GAPDH2 (AT1G13440) qRT-PCR	Papdi és mtsai., 2008
ZAT12-chipF	GTTGTCATGCCTTTGCTGG	Zat12 (AT5G59820) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
ZAT12-chipR	GGTCAGGTGTATTCTAGAAAGTGG	Zat12 (AT5G59820) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
WRKY30-chipF	AAAGGATCGAGAAGCAGAGAAC	WRKY30 (AT5G24110) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
WRKY30-chipR	CGAAGAAAGCTGATGTGGTTTG	WRKY30 (AT5G24110) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
Hsp17.6A-chipF	ACTTCTCCAACGATCAAGACG	Hsp17.6A (AT5G12030) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
Hsp17.6A-chipR	AGCAATGTAGAGAGAGCGATTG	Hsp17.6A (AT5G12030) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
TUA3-chipF	TTTCCTAAGCGGTTTCAGATTA AAG	TUA3 (AT5G19770) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
TUA3-chipR	GAATTGCTACTTAAGCTATCTTCCT AAC	TUA3 (AT5G19770) ChIP qPCR	Ez a tanulmány
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	HSFA4A (AT4G18880) klónozás	
T7 terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG	HSFA4A (AT4G18880) klónozás	
HSFA4A-S309D	CAAATCTCCTCCTGATCCAAGGAT CATC	HSFA4A (AT4G18880) mutagenézis	Ez a tanulmány
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGTG	pBluescript II SK+ vektor, szekvenálás	
M13 R	GGAAACAGCTATGACCATG	pBluescript II SK+ vektor, szekvenálás	
HSFA4A-HindIII	TGAGCAAGCTTATGGATGAGAATA ATCATGGAGTTTC	BiFC vektor klónozás	Pérez-Salamó és mtsai., 2014
HSFA4A-SmaI-NoStop	TGATTCCCGGGACTTCTCTCTGAA GAAGTCAGAT	BiFC vektor klónozás	Pérez-Salamó és mtsai., 2014

F2. Táblázat. A többszörös aminosav szekvencia illesztés során vizsgált fehérjék listája. A protein oszlop a Phytozome-ban (Version 12) használt génkódot jelöli. A kód oszlop a többszörös szekvencia illesztés és filogenetikai fa szerkesztése során használt szekvencia kódot jelöli (14. Ábra, F1. Ábra).

Protein	Kód	Faj
AT4G18880.1, HSFA4A	AthA	Arabidopsis thaliana
AT5G45710.1, HSFA4C	AthC	Arabidopsis thaliana
Araha.64421s0001.1	Aha1	Arabidopsis halleri
Cagra.4306s0004.1	Cgr1	Capsella grandiflora
Cagra.0796s0014.1	Cgr2	Capsella grandiflora
Carubv10004953m	Cru1	Capsella rubella
Carubv10026722m	Cru2	Capsella rubella
Bostr.30275s0365.1	Bst1	Boechera stricta
Thhalv10025409m	Esa1	Eutrema salsugineum
Brara.A00997.1	BraA	Brassica rapaFPsc
Brara.H00975.1	BraH	Brassica rapaFPsc
Bol009370	Bol1	Brassica oleraceacapitata
AL7G35300.t1	Aly1	Arabidopsis lyrata
AL8G12940.t1	Aly2	Arabidopsis lyrata
30026.m001484	Rco1	Ricinus communis
Manes.17G060600.1	Mes1	Manihot esculenta
Manes.S044100.3	Mes2	Manihot esculenta
Thecc1EG029630t1	Tca1	Theobroma cacao
Potri.011G071700.1	Ptr1	Populus trichocarpa
SapurV1A.3884s0010.1	Spu1	Salix purpurea
Orange1.1g015644m	Csi1	Citrus sinensis
Ciclev10015472m	Ccl1	Citrus clementine
Glyma.08G119900.3	Gma1	Glycine max
Prupe.4G068100.3	Ppe1	Prunus persica
Gorai.011G036400.4	Gra1	Gossypium raimondii
Eucgr.E02813.1	Egr1	Eucalyptus grandis
Medtr8g087540.1	Mtr1	Medicago truncatula
AHYPO_004336-RA	Ahy1	Amaranthus hypochondriacus
Kalax.0164s0029.1	Kla1	Kalanchoe laxiflora
Brast08G050400.1	Bsta1	Brachypodium stacei
LOC_Os01g54550.1	Osa1	Oryza sativa
AC205471.4_FGT003	Zma1	Zea mays
Sobic.003G295900.1	Sbi1	Sorghum bicolor

Multiple sequence alignment of 33 HSFA4 factors.

	cov	pid	DNA Binding Domain		
			Ser9,10,11,12	Ser65,66	
1 AthA	100.0%	100.0%	MDESNHGVS	SSS	55
2 Ahal	99.8%	91.8%	MDES	SSS	55
3 Aly1	99.3%	91.8%	MDES	SSS	55
4 Cgr1	99.5%	90.1%	MDESNHGVS	SSS	55
5 Cru1	100.0%	89.2%	MDDSNHGVS	SSS	55
6 Bst1	98.8%	90.8%	MDES	SSS	55
7 Esa1	97.3%	87.0%	MDES	SSS	55
8 BraA	95.3%	78.2%	MDES	SSS	55
9 Boll	94.3%	78.2%	MDES	SSS	55
10 BraH	90.5%	75.2%	MDES	SSS	55
11 AthC	84.6%	54.1%	MDE	SSS	55
12 Aly2	84.8%	55.0%	MDE	SSS	55
13 Cgr2	84.3%	55.1%	MDE	SSS	55
14 Cru2	84.3%	55.1%	MDE	SSS	55
15 Ahy1	95.0%	45.5%	MDDI	SSS	55
16 Gmal	95.0%	50.4%	MDDA	SSS	55
17 Mtr1	94.5%	47.3%	-MDE	SSS	55
18 Egr1	96.3%	48.9%	MDES	SSS	55
19 Rcol	94.8%	54.7%	MDES	SSS	55
20 Mes1	94.8%	53.8%	MDES	SSS	55
21 Mes2	95.8%	52.6%	MDKS	SSS	55
22 Ptr1	95.3%	53.1%	MDES	SSS	55
23 Spu1	95.3%	54.8%	MDES	SSS	55
24 Tcal	95.3%	52.9%	MDDA	SSS	55
25 Gra1	94.8%	52.5%	MDDA	SSS	55
26 Csil	94.5%	51.6%	MDDG	SSS	55
27 Ccl1	94.5%	51.4%	MDDG	SSS	55
28 Ppel	93.5%	50.0%	MDEV	SSS	55
29 Klal	97.5%	45.0%	MDES	SSS	55
30 Bstal	92.5%	33.3%	MSSSQSQGGGGRPP	SSS	55
31 Osa1	94.3%	36.5%	-MEG	SSS	55
32 Zmal	93.8%	32.2%	-MEG	SSS	55
33 Sbil	92.8%	36.0%	MEAG	SSS	55

consensus/70%

	cov	pid	DNA Binding Domain			Oligomerization Domain	
			Ser110,112	Thr124			
1 AthA	100.0%	100.0%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLQLAQL
2 Ahal	99.8%	91.8%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
3 Aly1	99.3%	91.8%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
4 Cgr1	99.5%	90.1%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
5 Cru1	100.0%	89.2%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
6 Bst1	98.8%	90.8%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
7 Esa1	97.3%	87.0%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
8 BraA	95.3%	78.2%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
9 Boll	94.3%	78.2%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
10 BraH	90.5%	75.2%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQAQ
11 AthC	84.6%	54.1%	DPQWEFLNDDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LVLAQA-Q
12 Aly2	84.8%	55.0%	DPQWEFLNDDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLAQA-Q
13 Cgr2	84.3%	55.1%	DPQWEFLNDDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LSLQA-Q
14 Cru2	84.3%	55.1%	DPQWEFLNDDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LSLQA-Q
15 Ahy1	95.0%	45.5%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LSLHGQV
16 Gmal	95.0%	50.4%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLAQA-Q
17 Mtr1	94.5%	47.3%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQA
18 Egr1	96.3%	48.9%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LPLLAQA
19 Rcol	94.8%	54.7%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
20 Mes1	94.8%	53.8%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
21 Mes2	95.8%	52.6%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
22 Ptr1	95.3%	53.1%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
23 Spu1	95.3%	54.8%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
24 Tcal	95.3%	52.9%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
25 Gra1	94.8%	52.5%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
26 Csil	94.5%	51.6%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
27 Ccl1	94.5%	51.4%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
28 Ppel	93.5%	50.0%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
29 Klal	97.5%	45.0%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
30 Bstal	92.5%	33.3%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
31 Osa1	94.3%	36.5%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
32 Zmal	93.8%	32.2%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS
33 Sbil	92.8%	36.0%	DPQWEFADDFVRG	PHLMK	IHRRK	VHSH	LQLLNQGSS

consensus/70%

			Oligomerization Domain	Ser198	NLS, MAPK docking	
	cov	pid	157			230
1 AthA	100.0%	100.0%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
2 Ahal	99.8%	91.8%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
3 Aly1	99.3%	91.8%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
4 Cgr1	99.5%	90.1%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
5 Crul	100.0%	89.2%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
6 Bst1	98.8%	90.8%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
7 Esa1	97.3%	87.0%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
8 BraA	95.3%	78.2%	DVFEQVKELKDDLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
9 Boli	94.3%	78.2%	DVFEQVKELKDDLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
10 BraH	90.5%	75.2%	EVFEMVKELKDDLQEMEKRRKQMA FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
11 AthC	84.6%	54.1%	KEFELVYVTKDRLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L EN---HERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
12 Aly2	84.8%	55.0%	KDFELVYVTKDRLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L EN---HERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
13 Cgr2	84.3%	55.1%	KDFEMVYVTKDRLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L EN---HERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
14 Cru2	84.3%	55.1%	KDFEMVYVTKDRLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L EN---HERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
15 Ahy1	95.0%	45.5%	QDLFQVQLVLRDLQEMEKRRKQMA FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
16 Gmal	95.0%	50.4%	QAVETDHCSPDLKLEKQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L EN---HERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
17 Mtr1	94.5%	47.3%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMV FVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
18 Egr1	96.3%	48.9%	KCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
19 Rco1	94.8%	54.7%	QCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
20 Mes1	94.8%	53.8%	KCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
21 Mes2	95.8%	52.6%	KCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
22 Ptr1	95.3%	53.1%	KCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
23 Spul	95.3%	54.8%	KCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
24 Tcal	95.3%	52.9%	QCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
25 Gra1	94.8%	52.5%	QCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
26 Csil	94.5%	51.6%	QCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
27 Cc11	94.5%	51.4%	QCFEMVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
28 Ppel	93.5%	50.0%	QGLFELQVPLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
29 Klal	97.5%	45.0%	EVFEMVKELKERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
30 Bstal	92.5%	33.3%	CGINWVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
31 Osa1	94.3%	36.5%	LNMKRMQVLEKELRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
32 Zmal	93.8%	32.2%	CGINWVQMLRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			
33 Sbi1	92.8%	36.0%	LNMKRMQVLEKELRERLQEMEKRRKQMDVYVSOVLEKPGGLAL L SPCVETNERKRRRFR IEFPPDEP MLEENQTCV			

consensus/70%

psfshhptk+llqemrpsshl+avupvlpkpgllh...sph...tpcrrrrfr+hshh...ss...hspsths..

			Ser227Thr238,Ser239	AHAL	
	cov	pid	231		270
1 AthA	100.0%	100.0%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
2 Ahal	99.8%	91.8%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
3 Aly1	99.3%	91.8%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
4 Cgr1	99.5%	90.1%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
5 Crul	100.0%	89.2%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
6 Bst1	98.8%	90.8%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
7 Esa1	97.3%	87.0%	VVR--ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
8 BraA	95.3%	78.2%	VVR--ECSTSR--DETERVEQLSSIAIWEVLVSDSC--ISV		
9 Boli	94.3%	78.2%	VVR--ECSTSR--DETERVEQLSSIAIWEVLVSDSC--ISV		
10 BraH	90.5%	75.2%	ECSTSPSSRREHVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
11 AthC	84.6%	54.1%	PPSSSHIEVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
12 Aly2	84.8%	55.0%	PPSSSHIEVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
13 Cgr2	84.3%	55.1%	PPSSSHIEVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
14 Cru2	84.3%	55.1%	PPSSSHIEVEQLSSIAIWEVLVS--DSC--ISM		
15 Ahy1	95.0%	45.5%	TS--GSPNVRFGDFPELLEEMERLHFWEVVEDLVNQ--R		
16 Gmal	95.0%	50.4%	MLP--ENADHTVLTNVERLDLEEMAFWEVVDHIGITF--VQI		
17 Mtr1	94.5%	47.3%	ALP--ENADNSTLTLNTERLDELAVGWEVLAHEVGGNF--VHT		
18 Egr1	96.3%	48.9%	TLR--ENIDGASLPSILDLYEQLSSIAIWEVIAHDCEN--I--GQR		
19 Rco1	94.8%	54.7%	AR--ENADNSVALSNVEQLSSIAIWEVIRDDVQT--N--IQR		
20 Mes1	94.8%	53.8%	TR--ENVDNNTAALSNEQLSSIAIWEVSIANDVEN--K--MQS		
21 Mes2	95.8%	52.6%	THG--ENADNSVACNMEQLSSIAIWEVSIINDVQI--N--AQI		
22 Ptr1	95.3%	53.1%	ALG--ENADNSVALLNMEQLSSIAIWEVVDHIGQTY--NYN		
23 Spul	95.3%	54.8%	ALG--ESDDNPSVLLNMEQLSSIAIWEVVDHVVQTH--NHN		
24 Tcal	95.3%	52.9%	IAI--ENAD--STSLNMEPEQLSSIAIWEVVDHFGQTN--IQL		
25 Gra1	94.8%	52.5%	ISR--NVD--STSLNMEPEQLSSIAIWEVVDHFGQTN--IQH		
26 Csil	94.5%	51.6%	IVG--ADSADITSSNMEKPEQLSSIAIWEVVDVGGSC--FQP		
27 Cc11	94.5%	51.4%	IVG--ADSADITSSNMEKPEQLSSIAIWEVVDVGGSC--FQP		
28 Ppel	93.5%	50.0%	AGI--ENA--DMEKPEQLSSIAIWEVVDVGGSC--IQV		
29 Klal	97.5%	45.0%	VAGT--EAVSATVSLSTEDNMEQLSSIAIWEVVDVGGSC--GEDVY--NVQTPPLAVILTEIDPLEGAGIN		
30 Bstal	92.5%	33.3%	AMVAETPQVLPVPTGLNAEPFQGLALVSLRIFQAGNYAPS--DVI--NAAAAPSSALALGNLQAAPHEGSTNVQP		
31 Osa1	94.3%	36.5%	LTNPPAQTFYRESFDKMSLNSLIFLREASEEF--GNDISYDDGVPGPSTVVTITELHSGPESDPRVSSP		
32 Zmal	93.8%	32.2%	TV--GAETP--SPIRLLSAEPFKMLALVSLRIFQAGNYAPS--DVI--NAAAAPSSALALGNLQAAPHEGSTNVQP		
33 Sbi1	92.8%	36.0%	LTNPPAQTFYRESFDKMSLNSLIFLREASEEF--GNDISYDDGVPGPSSAVVITELHSGPESDPRVSSP		

consensus/70%

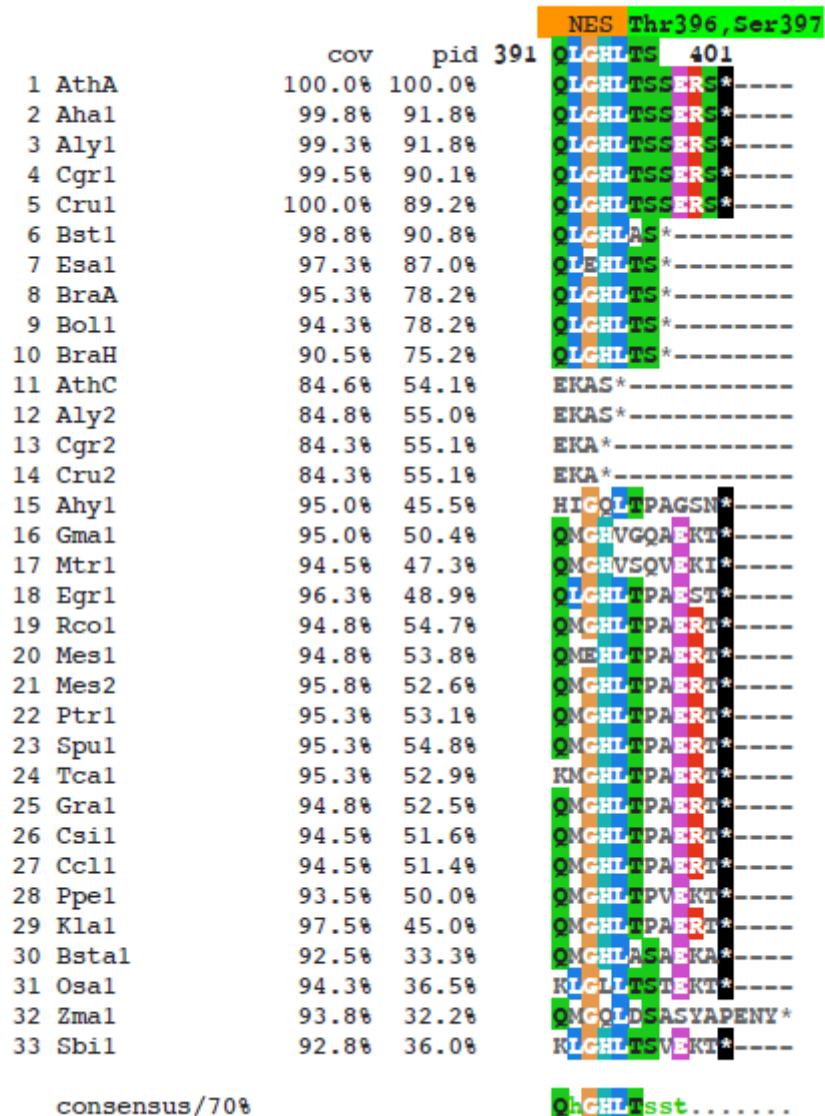
.h.t.t.ss.ssst.s.cph+llshwslip...psp...p.....

	cov	pid	
1 AthA	100.0%	100.0%	----- 271 Ser306Ser309 329 -----
2 Ahal	99.8%	91.8%	-----
3 Aly1	99.3%	91.8%	-----
4 Cgr1	99.5%	90.1%	-----
5 Crul	100.0%	89.2%	-----
6 Bst1	98.8%	90.8%	-----
7 Esa1	97.3%	87.0%	-----
8 BraA	95.3%	78.2%	-----
9 Boll	94.3%	78.2%	-----
10 BraH	90.5%	75.2%	-----
11 AthC	84.6%	54.1%	-----
12 Aly2	84.8%	55.0%	-----
13 Cgr2	84.3%	55.1%	-----
14 Cru2	84.3%	55.1%	-----
15 Ahy1	95.0%	45.5%	-----
16 Gmal	95.0%	50.4%	-----
17 Mtr1	94.5%	47.3%	-----
18 Egr1	96.3%	48.9%	-----
19 Rcol	94.8%	54.7%	-----
20 Mes1	94.8%	53.8%	-----
21 Mes2	95.8%	52.6%	-----
22 Ptr1	95.3%	53.1%	-----
23 Spul	95.3%	54.8%	-----
24 Tcal	95.3%	52.9%	-----
25 Gra1	94.8%	52.5%	-----
26 Csil	94.5%	51.6%	-----
27 Ccl1	94.5%	51.4%	-----
28 Ppel	93.5%	50.0%	-----
29 Klal	97.5%	45.0%	-----
30 Bstal	92.5%	33.3%	-----
31 Osal	94.3%	36.5%	-----
32 Zmal	93.8%	32.2%	-----
33 Sbil	92.8%	36.0%	-----

consensus/70%

	cov	pid	
1 AthA	100.0%	100.0%	----- 330 AHA2 390 -----
2 Ahal	99.8%	91.8%	-----
3 Aly1	99.3%	91.8%	-----
4 Cgr1	99.5%	90.1%	-----
5 Crul	100.0%	89.2%	-----
6 Bst1	98.8%	90.8%	-----
7 Esa1	97.3%	87.0%	-----
8 BraA	95.3%	78.2%	-----
9 Boll	94.3%	78.2%	-----
10 BraH	90.5%	75.2%	-----
11 AthC	84.6%	54.1%	-----
12 Aly2	84.8%	55.0%	-----
13 Cgr2	84.3%	55.1%	-----
14 Cru2	84.3%	55.1%	-----
15 Ahy1	95.0%	45.5%	-----
16 Gmal	95.0%	50.4%	-----
17 Mtr1	94.5%	47.3%	-----
18 Egr1	96.3%	48.9%	-----
19 Rcol	94.8%	54.7%	-----
20 Mes1	94.8%	53.8%	-----
21 Mes2	95.8%	52.6%	-----
22 Ptr1	95.3%	53.1%	-----
23 Spul	95.3%	54.8%	-----
24 Tcal	95.3%	52.9%	-----
25 Gra1	94.8%	52.5%	-----
26 Csil	94.5%	51.6%	-----
27 Ccl1	94.5%	51.4%	-----
28 Ppel	93.5%	50.0%	-----
29 Klal	97.5%	45.0%	-----
30 Bstal	92.5%	33.3%	-----
31 Osal	94.3%	36.5%	-----
32 Zmal	93.8%	32.2%	-----
33 Sbil	92.8%	36.0%	-----

consensus/70%



F1. Ábra. A 27 növényfaj 33 HSFA4-típusú fehérje többszörös szekvencia illesztése. A HSFA4A transzkripció faktor konzervált szekvencia elemeit különböző színnel jelöltük:

DNS kötő régió

Oligomerizációs régió

NLS, NES: sejtmagi lokalizációs és exit szignál

AHA1, AHA2: aktivátor motívumok

MAPK dokkoló régió

MPK3 és MPK4 foszforilációs helyek (szerin (Ser), treonin (Thr))

Más tömegspektrometriával azonosított foszforilációs helyek (Ser, Thr)

A konszenzus szekvenciák az illesztés alatt vannak.