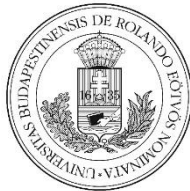


MAKAI SZABOLCS

A POLIMERKÉPZŐ GLUTENIN ALEGYSÉGFEHÉRJÉK SZABÁLYOZÁSI FOLYAMATAI BÚZÁBAN

C. DOKTORI ÉRTEKEZÉSÉNEK TÉZISEI



Témavezetők: Juhász Angéla PhD (tudományos osztályvezető) és Tamás László PhD (habilitált egyetemi docens)

Készült az ELTE Biológiai Doktori Iskola (vez.: Prof. Dr. Erdei Anna) Kísérletes Növénybiológiai Doktori Program (vez.: Prof. Dr. Szigeti Zoltán) keretében az MTA Agrártudományi Kutatóközpontjában 2015-ben.

BEVEZETÉS

A búza egyik legfontosabb tulajdonsága a búzaszem fehérje tartalma és ennek köszönhetően a sikértartalma. A terméshozam mellett ez a tulajdonság határozza meg a termény piaci értékét, így ennek minőségi és mennyiségi javítása kiemelt nemesítési cél. Általánosan elfogadott, hogy a búzaszem tartalékfehérje tartalma rendkívüli módon függ a genetikai és környezeti hatásoktól. A siker kialakulása szempontjából a tartalékfehérjék két fontos típusa a kis és nagy molekulatömegű glutenin alegységfehérjék (LMW- és HMW-GS).

Noha a kis és nagy molekulatömegű gluteninek minőségi tulajdonságokkal való összefüggése egy igen részletesen tanulmányozott kutatási terület, a glutenin gének expressziójának folyamatáról jelenleg kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Pontosan nem ismerjük, hogy mi indítja el az expressziójukat, mi okozza a termelődésük leállítását és mi biztosítja a szövetspecifikus termelődésüket. Nem tisztázott a gének promótereiben található különböző *cis*-szabályozó elemek szerepe, illetve nem ismert az ezekhez kapcsolódó transzkripciós faktorok pontos funkciója. Eddig megjelent eredmények alapján a kénben gazdag kis molekulatömegű glutenin és a gliadin gének *cis*-szabályozás mellett epigenetikailag is szabályozottak, míg a nagy molekulatömegű glutenin alegység gének esetében a metiláció nem játszik szerepet a szabályozásban [1]. Az egyes kutatócsoportok

többször csak egy-egy gén alapvető szabályozását vizsgálták, ám a szabályozás jobb megértése megkívánja a teljes géncsaládok promóter szekvenciájának jellemzését, és az expressziós profiljukkal való összevetését.

A modern nemesítők a genetikai és legújabban a genomikai eredmények felhasználásával, az ott felhalmozott ismeretek mentén határozzák meg céljaikat. Habár a prolaminok minősége (egész pontosan kedvező allélikus összetétele) már egy régi nemesítési cél, e fehérjék mennyiségét befolyásoló tényezők még nem ismertek, márpedig az ezekre irányuló célirányos szelekció nagyban segítené a nemesítők munkáját [2]. A környezeti hatások kialakulása és erőssége a tartalékfehérje génekkel kölcsönható transzkripciós faktoroktól függ, ezáltal a környezeti befolyásoltság mértéke feltételezhetően maga is genetikailag meghatározott folyamat. Mindezt felismerve, hisszük, hogy ha a polimerképző sikerfehérjék szabályozását részleteiben megismerjük, hosszútávon képesek leszünk a környezeti hatásoktól való függését enyhíteni és a hozamot stabilizálni (avagy a potenciális és a várható hozamot közelíteni).

A kutatómunka során célunk volt a fehérjemennyiség és ezáltal a siker polimer kialakulásában kiemelt szerepet játszó HMW és LMW glutenin génekhez tartozó promóter szekvenciák *cis* regulációs elemeinek összehasonlítása, jellemzése, az adatbankokban található gének expressziós adatainak *in silico* feldolgozása, a velük kölcsönható transzkripciós faktorok

azonosítása és a szabályozási folyamatokra egy-egy lehetséges „mechanikai” modell kidolgozása - követve Werner és munkatársai gondolatmenetét [3]. Ennek értelmében a kutatómunkám során az alábbi feladatokat határoztuk meg:

1. A HMW glutenin gének promótereinek funkcionális elemzése, változásainak összevetése saját és kölcsönható transzkripció faktorok génaktivitási adataival, majd egy szabályozási modell leírása, illetve javaslat a nemesítési programokban a siker mennyiséggel és minőséggel közvetlen kapcsolatba hozható célgénekre.
2. A HMW glutenin gének promótereinek filogenetikai vizsgálata. Az x és az y-típusú gének duplikációt követő szétválásának lehetséges funkcionális következményeinek leírása. Iránymutatás a tartalékfehérjék szempontjából megfontolandó keresztezési alanyok kiválasztására.
3. LMW glutenin gének promótereinek funkcionális elemzése, összevetése a génaktivitási adatokkal és a feltételezhető átírási mechanizmus feltárása.
4. A HMW-GS szövetspecifikusságát okozó folyamatok kísérletes vizsgálata a felállított modell alapján.

MÓDSZEREK

A vizsgálatunk tárgyát képező LMW illetve HMW glutenin alegységfehérje gének alléljai nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutatnak. Expresszió szintjük mérése microarray módszerekkel

lehetetlen a kereszt-hibridizáció magas mértéke miatt. Hasonló problémák jellemzik a transzkripciós faktorok expressziójának mérését is. Ugyanazon családhoz tartozó TF-ok közötti különbség a hibridizációs technológiák alkalmazhatósága szemszögéből legtöbbször minimális. Ugyanakkor a promóterek és TF-ok funkcionális jellemzéséhez elengedhetetlen az expressziós szintek pontos mérése az allélok szintjén. A kutatómunka legelső lépése tehát egy igen nagy érzékenységű, ám egyszerű expresszióméter (vagy transzkriptométer) fejlesztése volt. Ezzel majdnem párhuzamosan készült el a promóter szekvenciák grafikai megjelenítését szolgáló promóter profilozó alkalmazás, amely az adatok egyedi vizualizációjával segítette a munkánkat. A promóterek moduljainak felderítésére íródott a Modul Detektív perl-szkript csomag, ami a motívumok és motívumcsoportosulások jelentőségét mérte. Vizsgálatainkba 156 db HMW-GS és 360 db LMW-GS szekvenciát vontunk be, ezek közül 122 és 170 db rendelkezett értékelhető hosszúágú (500 bp-nál nagyobb HMW-GS esetén illetve 30 bp-nál nagyobb LMW-GS esetén) promóterrel. A promóterek elemzéséhez Place és PlantCare adatbázisokat illetve az irodalom alapján azonosított *cisz* motívumokat használtunk. Ahogy nőtt a kutatásba bevont adatok száma, úgy vált egyre inkább szükségessé az eredmények intuitívabb, emberileg jobban értelmezhető feldolgozásának módja. Ezért kidolgoztunk egy új ko-expressziós hálózatszerkesztési eljárást, amely a gráfelmélet bevonásával segítette a genetikai alhálózatok detektálását. A

filogenetikai elemzésnél 139 a *Triticeae* törzshöz tartozó HMW-GS promótert vizsgáltunk.

A HMW-GS promóter funkcionális elemzésénél génbelővésen alapuló tranziens génexpressziós kísérleteket végeztünk. A konstrukció építésénél párhuzamosan használtuk a promóter ABRE|CBF motívumklaszterének szubsztitúciós és deléciós mutánsait. A PBF gén promóterének izolálását nested PCR-rel és klónozással végeztük.

EREDMÉNYEK

A HMW-GS gének promóter mintázata jellegzetesen eltér a gén két paralógja, az x- és az y-típusú gének között.

A HMW-GS promóterén 6 jól elkülönülő, erősen konzervált promóter modult azonosítottunk, ezeket „bazális” illetve CRM1-CRM5 néven jelöltük.

Kísérletesen igazoltuk, hogy a CRM1-es modul ABRE|CBF motívumcsoportja különleges befolyással bír a HMW-GS gének szövetspecifikus átíródásának szabályozásában.

A ko-expressziós hálózat alapján összesen hat kis szabályozó kört azonosítottunk, név szerint: Glu1x, Glu1y, „Korai”, „Vezérlő”, ABI3 illetve ABA/L1L kapcsolt.

A paralóg HMW-GS gének önálló alhálózatokba tömörültek a HMW-GS és transzkripciós faktorok ko-expressziós hálózatában.

A paralóg HMW-GS gének eltérő módon reagálnak a környezeti hatásokra.

Az LMW-GS gének leginkább a x-típusú HMW-GS gének alhálózatába tömörülnek.

Az LMW-GS gének expressziója két jellemzően eltérő aktivitás dinamika mentén alakul.

A két glutenin gén expresszió szintjét leginkább meghatározó „Vezérlő” program időbeni lefutása genotípusonként eltérő lehet. Így az ebben a programban azonosított TF-k (pl. SPA és PBF) kiemelkedő szerepet játszanak a glutenin gének expressziójának genotípusok közötti eltéréseiben.

A promóterek izolálását és szekvenálását követően megállapítottuk, hogy PBF-5A és -5B lókuszokon kódolt PBF gén promótere jelentősen eltér a Glenlea és Chinese Spring között.

A *Triticeae* törzs HMW-GS promótereinek összehasonlítása alapján a kenyérbúza promótere alig változott a kenyérbúza 10 000 éves története alatt.

Az x- és y-típusú promóterek között megfigyelhető különbségek graduálisan alakultak ki egy hibrid típusú promóterből.

KÖVETKEZETÉSEK

Újszerű megközelítésünk és a célnak megfelelően fejlesztett információs technikai eszközeink lehetővé tették a HMW és

LMW glutenin gének promóter szerkezetének alapos tanulmányozását és moduláris szerkezetének leírását. A feltárt *cisz* szabályozó modulok motívum összetétele változott a glutenin gének típusa (x vagy y, illetve s, i vagy m) illetve kromoszómális elhelyezkedése szerint (A, B vagy D). A változások jól dokumentálható aktivitás különbségekkel járnak együtt.

Az LMW glutenin géneknél tapasztalt eltérések a promóterek között rámutattak arra, hogy az LMW glutenin géneknél fontos a genetikai hatás. A HMW-GS promóterek esetén azonban az allélikus variancia alig jellemző, ami egyrészt arra utal, hogy fontos szelekciós tényező lehet. Másrészt viszont továbbra is nyitva hagyja a kérdést, hogy mi befolyásolja a különböző genotípusok esetében megfigyelt aktivitás különbségeket.

A kérdésre a jelenlegi adataink fényében egyetlen választ találtunk megalapozottnak. Eszerint a búza nemesítése során a vizsgált tartalékfehérje gének nem vagy csak alig változtak, ellenben a velük kölcsönható transzkripciós faktorok aktivitása változott a különböző nemesítési vonalak között. A *Triticeae* nemzetség családhoz tartozó HMW glutenin gének promóterei visszaigazolták feltevésünket. A kódoló gének és a hozzájuk tartozó szabályozó régiók nagyfokú konzerváltsága a búza rokonsági körén belül arra utal, hogy a promóter erőssége nehezen fokozható. Minden eltérés a tartalékfehérjék transzkripciós dinamikájában a kölcsönható TF intenzitásának függvénye. Ezt támasztják alá a génexpressziós vizsgálataink

eredményei is. A jellemzően eltérő sütőipari minőséggel bíró Glenlea és Chinese Spring genotípusok között a „Vezérlő” génprogram kinetikája markáns különbséget mutatott. Ezen eltérést részben magyarázza, hogy az 5A és 5B kromoszómákon található PBF gének promóterei a bemutatott eredmények szerint jelentősen eltérnek a vizsgált két genotípus között. Ez a szignifikáns különbség további genotípusok elemzését követően alkalmassá válhat a fehérjetartalommal és a kedvező minőséggel társuló siker fehérjék mennyiségével, ill. arányával kapcsolatba hozható markerek fejlesztésére.

A *Triticeae* nemzetség családnhoz tartozó fajokon végzett filogenetikai elemzéseinkkel betekintést nyertünk a HMW glutenin gének evolúciójába illetve nemesítési történetükbe. A megszerkesztett filogenetikai fa topológiája alapján igazoltuk, hogy az y-típusú promóterek kevésbé szerteágazóak, mint az x-típusúak. Számos olyan motívum eltűnt az y-típusú promóterekből, amely a vizsgált *Elymus*, *Dasopyrum*, *Leymus* fajokban még x-y hibrid jellegű promóterekben jelen volt.

Feltételezhető, hogy a kezdetben erős, intenzitásában az x-típusú génekhez közelítő, környezeti hatásoknak való kitettségében viszont az y-típushoz hasonlító HMW glutenin 'ősgén' promóter a duplikációt követően szétvált. Az x-típus aktivitása stabilizálódott az endospermiumban, valamelyest levált a környezeti hatások jelátviteli csatornáiról, míg a y-típusú

promóter megőrizte a környezeti hatásoknak való kitettségét és így a 'ballaszt' szerepét az N/C egyensúly kényes fenntartásában.

A munka során kirajzolódott eredmények alapján a korábbi HMW glutenin marker szelekciós nemesítési stratégia helyett javasolt a fehérje tartalommal és a kedvező sikerminőséggel összefüggésbe hozható nemesítési stratégiát az alábbiakban foglalnánk össze: (i) Vadfajok keresztezésénél célszerű lenne az y típusú HMW glutenin gének promótereit közelíteni az x-típusú promóterhez vagy legalább vad típusokban talált hibrid promóterekhez. (ii) Szelekciós marker tervezésnél javasolt az egyes erősen konzervált célgének expressziós szabályozásában szignifikáns szerepet játszó transzkripciós faktorok, így például a PBF TF promóterét használni, mint fehérjetartalommal összefüggésbe hozható markert.

FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Wen S, Wen N, Pang J, Langen G, Brew-Appiah R a. T, és mtsai. (2012) Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health. *Proc Natl Acad Sci* 109. doi:10.1073/pnas.1217927109.
2. Petolino JF, Davies JP (2013) Designed transcriptional regulators for trait development. *Plant Sci* 201-202: 128–136. doi:10.1016/j.plantsci.2012.12.006.
3. Werner T, Fessele S, Maier H, Nelson PJ (2003) Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation. *FASEB J* 17: 1228–1237. doi:10.1096/fj.02-0955rev.

A SZERZŐ TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEI

S. Makai, G. He, L. Tamás, A. Juhász, In silico analysis of HMW glutenin's transcriptional regulation in wheat., in: 11th Int. Gluten Work., 2013: o. 78–81.

A. Juhász, S. Makai, E. Sebestyén, L. Tamas, E. Balazs, Role of conserved non-coding regulatory elements in LMW-glutenin gene expression, PLoS One. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0029501.

S. Makai, C. Éva, L. Tamás, A. Juhász, Multiple elements controlling the expression of wheat high molecular weight glutenin paralogs, Funct. Integr. Genomics. (2015). doi:10.1007/s10142-015-0441-4.

S. Makai, L. Tamás, F. Békés, A. Juhász, Domestication bottleneck and genetic variety of glutenin genes in wheat, in: Adv. Plant Breed. Biotechnol. Tech., Pannonian Plant Biotechnology Association, Martonvásár, 2014: o. 10–11.

S. Makai, A. Juhász, E. Balázs, L. Tamás, A simple and efficient way to in silico study expression of highly similar genes highly, in: 1st Congr. Cereal Biotechnol. Breed., 2011. doi:10.6084/m9.figshare.1254162.

S. Makai, L. Tamas, A. Juhasz, Distinct regulatory modules identified in the promoters of wheat Glu-1 genes suggest different regulatory mechanisms, Cold Spring Harbor Labs Journals, 2014. doi:10.1101/011635.

A. Juhász, S. Makai, E. Sebestyén, L. Tamás, E. Balázs, In-silico analysis of the transcriptional regulation of low molecular weight glutenin subunit genes in wheat., in: 1st Congress of Cereal Biotechnology and Breeding: Book of Abstracts, 2011: o. 21.