

GLUTÉNÉRZÉKENYSÉG ÉS STRIGOLAKTONOK: NEM ALLERGÉN BÚZA GENOTÍPUSOK ÉS EGY ŐSI JELÁTVITELI ÚT NYOMÁBAN

SOÓS VILMOS ÉS GELL GYÖNGYVÉR
Alkalmazott Genomikai Osztály

Bevezetés

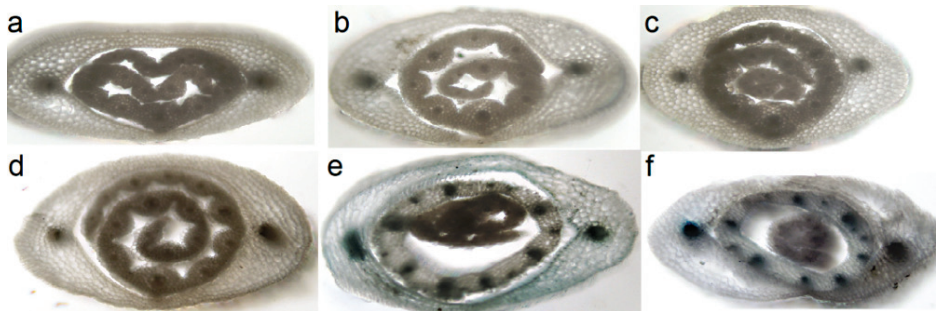
Az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete 2004 végén létesítette az Alkalmazott Genomikai Osztályt azzal a céllal, hogy a K+F+I bázisaként egyrészt egy korszerű műszerparknak adjon otthont, másrészt pedig az Intézetben belül és a közép-dunántúli régió szintjén kiszolgálja a felsőoktatási, akadémiai intézményekben, vállalkozások keretei közt folyó alap és alkalmazott kutatás és fejlesztő tevékenység – különösen a nemesítés és molekuláris biológiai, genomikai kutatás - igényeit. Célja továbbá, hogy helyzeti előnybe hozza az Intézettel kapcsolatban lévő biotechnológiai és nemesítési spin-off cégeket, hatékonyabbá tegye a vállalkozói és akadémiai szféra közti együttműködést.

Az osztály történetének eddigi 16 éve alatt több párhuzamos témában folytak kutatások. Ezek közül kettő nagyban meghatározta az elmúlt 10 év tudományos profilját. Így foglalkozunk a búza rokonsági körébe tartozó fajok, különösen a martonvásári gabona génbankban fenntartott vad és természetesen alakor genotípusok allergén fehérjéinek azonosításával és elemzésével, valamint a tartalékfehérjét kódoló gének szabályozásával a legújabb bioinformatikai, hálózatelemzési és *in vitro* szövettenyésztési módszerekkel. A strigolakton projektben arra keresünk választ, hogy a növény fejlődését és felépítését, különösen a fényfüggő jelátvitelt és az elágazódást hogyan szabályozzák az újonnan leírt növényi hormonok.

Gabona allergén tartalékfehérjéinek vizsgálata és expressziójának szabályozási folyamatai

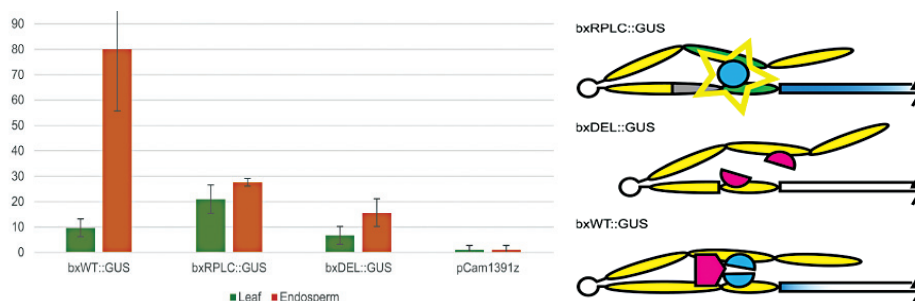
A prolamin típusú (prolinban gazdag) tartalékfehérjék a gabonaszem csírázásakor a fiatal növény számára nitrogén-, és kénforrást jelentenek, de több közülük az állati takarmányozás és emberi táplálkozás szempontjából is alapvető fontosságú. Ilyenek pl. az árpa hordeinjei, a kukorica zeinjei, vagy a búza glutenin (sikérvérvető) fehérjéi. Az osztályon behatóan vizsgáltuk a szálkaperje (*Brachypodium distachion* L. P. Beauv.) tartalékfehérjéit is. Ez a kicsi, könnyen nevelhető fűfaj a fontos gabonák modellje lehet. Nem kerültük meg ugyanakkor a szálkaperjénél jóval bonyolultabb genetikájú, de humán szempontból sokkal

fontosabb gabona, a búza prolamin típusú tartalékfehérjéinek vizsgálatát sem. Közülük a kis molekulású (Low Molecular Weight) glutenin fehérjék jelentősége alapvető a kenyértészta nyújthatóságában, míg a nagy molekulású (High Molecular Weight) glutenin fehérjék biztosítják a kenyértészta rugalmasságát. Nagy jelentőségű tehát ezen fehérjék és kódoló génjeik szabályozásának megértése, annak tisztázása, hogy miért termelődik belőlük sok vagy kevés, és így miért lesz jobb vagy rosszabb minőségű a kenyérgabonánk. A kapott ismereteket a nemesítésben lehet hasznosítani, a minőség javítására. Sajnos sokaknak a glutenin fehérjék táplálkozási problémákat okoznak (pl. cöliákia, Crohn-betegség). A HMW gluteninek az LMW-knél kevésbé immunogének, részarányuk növelése így egészségügyi szempontból is kívánatos. Az osztályon az LMW és a HMW glutenin fehérjék szabályozásával kapcsolatban több publikáció is született (Juhász et al., 2011; Makai et al., 2015, 2016; Éva et al., 2018). A prolamin fehérjék szabályozása döntően szövet- és fejlődés-specifikus: a gabonaszem endospermiumában, a virágzás utáni napoktól kezdve termelődnek. Ezt kettős szabályozás hozza létre: egyrészt a serkentő faktorok (pl. az abszcizinsav hormon és jelátviteli faktorai) szerepe alapvető a magban a prolamin gének bekapcsolásában, másrészt a vegetatív szervekben (gyökér, levél, szár) a gátló faktorok akadályozzák meg ezen tartalékfehérje-gének kifejeződését. Az osztály eredményei is arra utalnak ugyanakkor, a gátlók egyes esetekben kis mennyiségben a célszervben, a magban is jelen vannak és biztosítják a szabályozást. A gátlók kiütésével tehát elvileg növelhetnénk a gabonamag tartalékfehérje hozamát. A szabályozás több lépcsős. Az epigenetikai szabályozás ugyanis zárttá, pl. feltekeredetté teszi a prolamin géneket tartalmazó kromoszómaregiókat a célszerven kívül. Igazoltuk, hogy a búza HMW gluteninek termelését az epigenetikai tényezők közül a hiszton acetiláció szabályozza, serkenti a magban, még ennek hiánya gátolja más szervekben. Hiszton hiperacetilációt okozva be tudtuk kapcsolni a HMW promótereket a célszerven kívül, a szár szállítószöveibeiben. A prolamin gének szabályozásában ugyanakkor a legfontosabbnak a transzkripcionális szabályozást tartják, a gén promóteréhez, az RNS-polimeráz kötőhelyéhez kötődő gátló vagy serkentő transzkripció faktor fehérjék révén. Az osztályon a Brachypodium prolamin gének, valamint búza LMW és HMW glutenin gének promótereit is jellemeztük (Juhász et al., 2011; Makai et al., 2015). Új bioinformatikai eszközöket (programokat, adatbázisokat) alkottunk, és segítségükkel promóterelemeket írtunk le (Juhász et al., 2011; Makai et al., 2015, 2016).

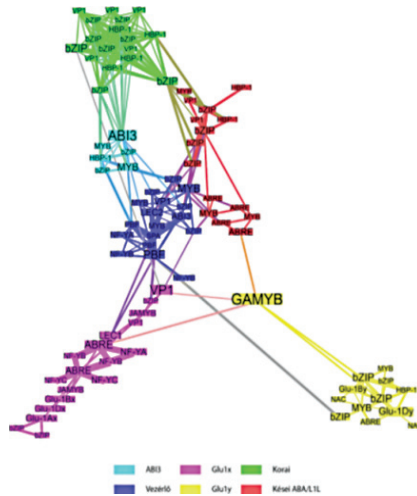


1. ábra. Kezeletlen (a, b, c) és TSA hiszton deacetiláz inhibitorral (hiszton hiperacetilációt okoz) kezelt (d, e, f) árpa magoncok szárának keresztmetszete. Nem transzgenikus Golden Promise árpa (a,d), Bx HMW promóter :: GUS riportergén konstrukciót (b, e) és By HMW promóter :: GUS riportergén konstrukciót hordozó transzgenikus árpanövények

Ezek szerepét később laboratóriumi módszerekkel elemeztük. A búza HMW glutenin promóterekben általunk leírt ABRE|CBF motívumcsoportról igazoltuk, hogy a magon kívül, a levélben gátolja a HMW glutenin fehérjék termelését (1. ábra). Riportergénés transziens expressziós kísérletben az ABRE-CBF kicserélése azonos hosszúságú értelmetlen szekvenciára felerősítette a Bx HMW promóteret a levélben, ám a törlés rontotta az aktivitást, változott a promóter szerkezete (2. ábra). Ezt egy DNS-hajlításon alapuló HMW-promóter-működés modellel magyaráztuk, amelyben a transzkripció starthelytől távol kapcsolódó transzkripciós faktorok is ráerősíthetnek a transzkripcióra, így biztosítva ezen promóterek rendkívüli erősségét a magban. Ezek az erős promóterek biotechnológiai alkalmazásokra, pl. gyógyászati szempontból fontos fehérjék magbéli termeltetésére is alkalmasak lehetnek.



2. ábra. Vad típusú (bxWT), valamint ABRE|CBF motívumcsoport deléció (bxDEL) és ABRE|CBF cserélős (bxRPLC) HMW GS promóterek aktivitása a célszervben, búza endospermiumban (barna) és levélben, a célszerven kívül (zöld). Az ABRE|CBF deléciója elrontja a promóter szerkezetét, a kezdeti és távolabbi promóterszakaszhoz kapcsolódó bZIP és DOF faktorok nem tudnak interaktálni



3. ábra. X és Y típusú HMW gluteninek és szabályozó faktoraik ko-expressziós hálózata

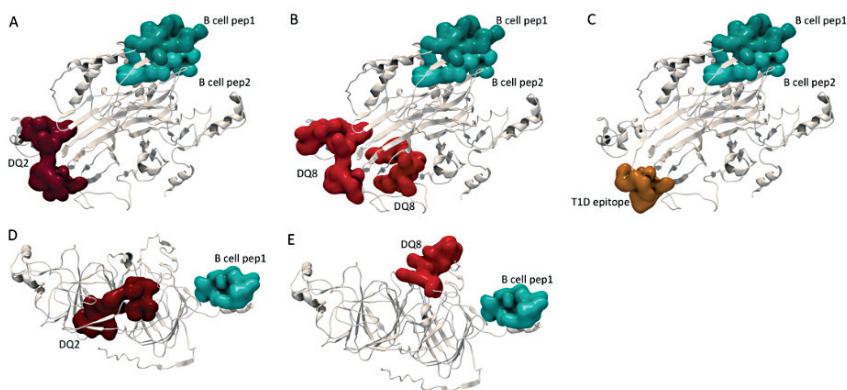
További HMW-promóterelemek és a hozzájuk kötődő transzkripciós faktorok vizsgálata jelenleg is folyik az osztályon. A transzkripciós faktor gének maguk is nemesítési célobjektumok, meghatározhatják egy gabonafajta sütőipari tulajdonságait. A prolamin géneket szabályozó transzkripciós faktorokat többek között bioinformatikai módszerekkel, transzkripciós ko-expressziós hálózat létrehozásával vizsgáltuk (3. ábra). A térben, időben azonos ko-expresszió a faktor és a célgén közötti szabályozásra utalhat, így pl. hálózatunkban az Y-típusú HMW gluteninek bZIP és NAC transzkripciós faktorokkal kerültek egy alcsoportba, így ezen faktorok szabályozása alatt állhatnak. Persze a ko-expresszió ténye sok esetben fals pozitív jelet ad, de a mi hálózatunkban fókuszálással sok irreleváns kapcsolatot, elemet, sikerült kiszűrni. A fókuszált hálózatunkat, mint módszert a szakma jól fogadta, ami nemcsak búza tartalékfehérje-gének szabályozásának vizsgálatára lehet alkalmas.

A prolamin fehérjék termelődését az említett fejlődés és szövetspecifikus szabályozás, valamint az egyes gabonafajták közötti genetikai különbségeken túl a környezeti tényezők, (pl. víz-, kén- és nitrogén-ellátottság) is nagymértékben befolyásolják. A nemesítés célja lehet, hogy ezen fontos magi tartalékfehérjék termelését lehetőleg függetlenítse a változékony környezettől, mindig magas szinten tartsa, így pl. a kenyérbúza kedvezőtlen évben se csússzon át takarmánybúza kategóriába. Az osztály érdekes eredménye, hogy a búza HMW gluteninek egy csoportja, az X-típus termelése viszonylag független a környezettől, míg egy másik csoport, az Y-típusú HMW-gluteninek szintje kedvezőtlen körülmények között letörik. Felvetettük, hogy a minőség szempontjából különben jelentős Y-típusú HMW glutenineket X-típusú szabályozással kellene ellátni és így garantálni a magas termelésüket.

Gabonafélék allergén fehérjéinek vizsgálata

A kutatás a búza rokonsági körébe tartozó fajok allergén, illetve immunogén fehérjéinek azonosításával és elemzésével foglalkozik. Vizsgáljuk az egyes fehérjékben jelenlevő, kóros folyamatokat kiváltó peptidok eloszlását és mennyiségét, valamint ezen fehérjék termelését.

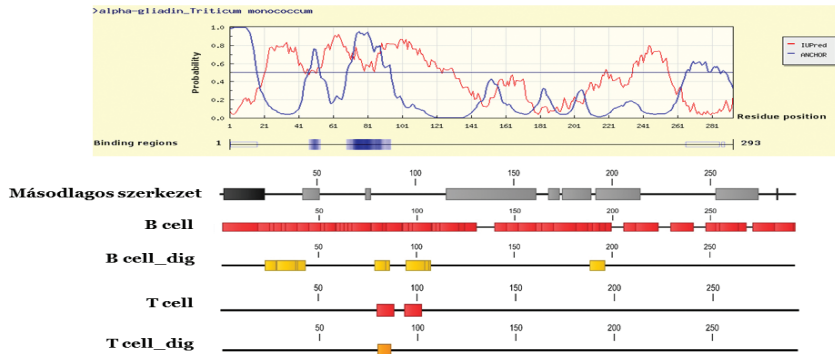
A búza és a rokonsági körébe tartozó gabonafélék (árpa, rozs) kiváltotta egészségügyi problémák, mint például a lisztérzékenység (cöliákia) vagy a különböző allergiák (pékasztma, anafilaxis stb.) egyre nagyobb problémát jelentenek a fogyasztók számára. Az egyes betegségek előfordulási gyakorisága az utóbbi évtizedekben jelentősen nőtt. Az allergének megismerése, a kóros immunreakciókat kiváltó fehérje szakaszok (az úgynevezett epitópok) azonosítása ezért fontos feladat. A különböző betegségek kialakulásáért a búza szemben található fehérjék és ezek közül is elsődlegesen a prolamin szupercsaládba tartozó tartalékfehérjék a felelősek. A gliadinok lisztérzékenységben betöltött szerepe régóta ismert, ugyanakkor kutatásainak alapján a prolaminok más tagjai, valamint egyes nem prolamin jellegű magfehérjék is hasonló mennyiségben és eloszlásban tartalmaznak immunreaktív fehérje szakaszokat, ezért ezeket a fehérjéket vizsgáltuk *Brachypodium distachion* modellnövényen (Gell et al., 2017).



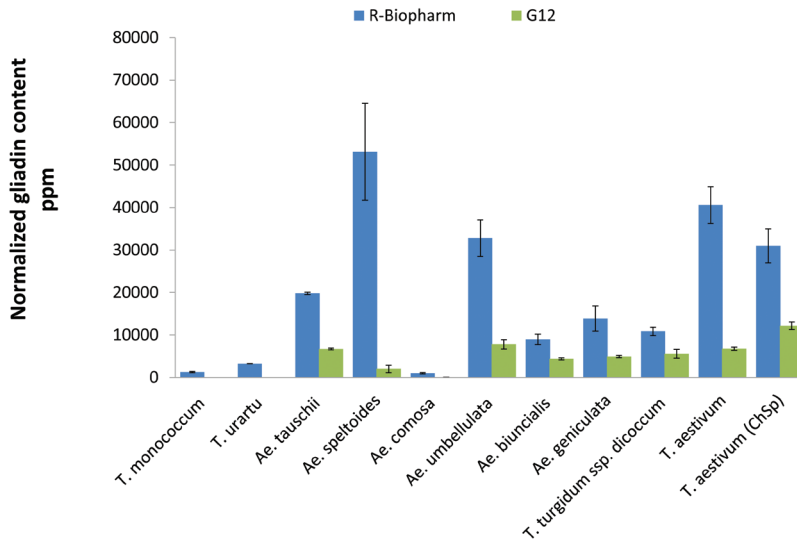
4. ábra. *Brachypodium* 7S globulin (I1GPS5) és 11S globulin (I1H9) fehérjéinek *in-silico* szerkezet predikciója

Kutatásaink célja ezeknek az immunreaktív szakaszoknak a pontos feltérképezése, az egyes fehérjecsaládok betegségtípusokban betöltött szerepének megismerése, továbbá olyan gabonaforrások azonosítása melyek csökkent allergén tartalommal rendelkeznek. Vizsgálatainkhoz elsődlegesen proteomikai, immunanalitikai és bioinformatikai, szerkezetbiológiai módszereket használunk (4-6. ábra).

A 'Triticum monococcum L. ssp. monococcum proteomikai és immunológiai vizsgálata különböző búzához köthető megbetegedések tükrében' című OTKA PD pályázat keretében a martonvásári gabona génbankban fenntartott vad és természetett alakor genotípusok tartalékfehérjéit vizsgáltuk abból a célból, hogy lisztjüket fogyaszthatják-e lisztérzékenyek, illetve gabona allergiában szenvedők.



5. ábra. Egy alakor alpha gliadin fehérje lisztérzékenységet kiváltó T-sejt és B-sejt specifikus epitópjainak eloszlása. A legtoxikusabb epitópok pozíciója megegyezik a fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakítására képes kötő szakasszal

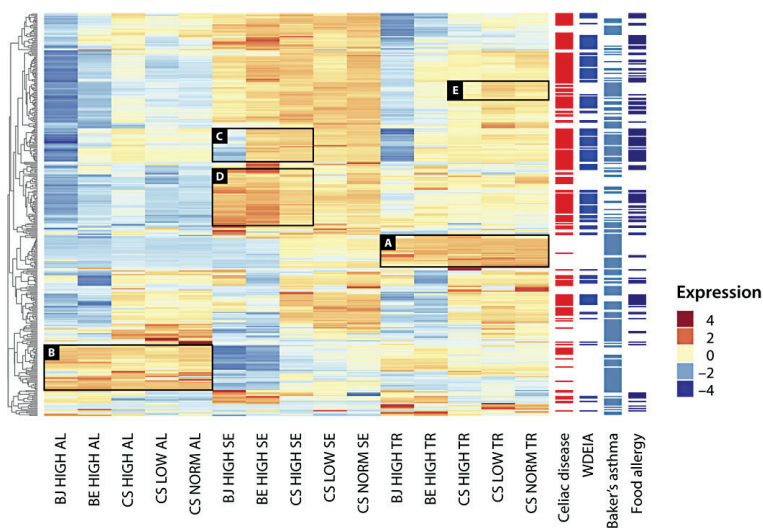


6. ábra. Az alakor, a kenyérbúza és vad rokon fajok gliadin tartalmának alakulása normalizált G12 és R5 ELISA mérések alapján

Búza klímaadaptációs vizsgálatok

A klímahatások vizsgálata a termesztett gabonák minőségére, mennyiségére, és ennek élelmiszerbiztonsági vonatkozásai kulcsfontosságúak az utóbbi évtizedekben. A változó abiotikus stresszkek, így az emelkedő hőmérséklet, a vízhiány, a dúsuló légköri széndioxid hatással van a gabonafélék terméshozamára, károsan befolyásolhatja azok tartalékfehérje összetételét, így a búza sütőipari minőségét meghatározó tézta reológiai tulajdonságait. A hazai időjárási viszonyokat modellező abiotikus stressz kezeléseket ezért nagyban hozzájárulhatnak a kenyérbúzáknak terméshozamának, klímaadaptációs képességének felderítéséhez, a toxikus fehérje tartalom mennyiségi változásának nyomon követéséhez.

A fehérjék azonosításán túl a környezeti hatások szerepének feltárása is a kutatás fontos eredménye. Az egyes fehérjék eltérő mennyiségben termelődnek a búzaszemben, amit a környezet is jelentősen befolyásol. A tenyészidőszak végének hűvösebb időjárása a pékasztmát és az ételallergiát kiváltó fehérjék koncentrációját emeli. Virágzáskori hőstressz esetén nagyobb a cöliákiával és a WDEIA-val kapcsolatos fehérjék mennyisége (7. ábra). E felismerés azért is fontos, mert a gyakoribb hőhullámok nemcsak a termés mennyiségére és minőségére, hanem az egészséget befolyásoló fehérjék mennyiségére is hatnak.



7. ábra. A sejtípus, genotípus és a hőmérséklet hatása a gabonaallergéneket kódoló gének transzkripciós szintjeire. A hőterkép a referencia-allergéneket kódoló gének relatív transzkriptom szintjeit mutatja a sejtípusok, genotípusok (BJ – Bjarne; BE - Berserk; CS – Chinese Spring) és különböző hőmérsékletek függvényében (csak CS). Referencia allergének transzkripciójának összefüggése a cöliákiával, WDEIA-val, pékasztmával és élelmiszerallergiával

Ismerve az immunreaktív fehérjeszakaszok fehérjén belüli pozícióját és az e fehérjéket kódoló gének kromoszómán belüli elhelyezkedését, lehetőség nyílik a csökkentett allergén- és antigéntartalmú búzafajták azonosítására, nemesítésére. Így például genomszerkesztési módszerek (pl. a CRISPR/Cas9) segítségével célirányosan módosíthatjuk vagy távolíthatjuk el az immunreakciót kiváltó szakaszokat anélkül, hogy megváltoztatnánk a fehérjének a búzanövény életani folyamataiban, vagy funkcionális tulajdonságaiban betöltött szerepét. A most azonosított fehérjeszakaszokra tervezett genetikai és biokémiai markerek pedig lehetőséget nyújtanak a kedvező összetételű és tulajdonságú fajták szelektálására, a nyersanyag összetételének feldolgozóipari ellenőrzésére (Juhász et al., 2018).

A *Genome mapping of seed-borne allergens and immune-responsive proteins in wheat* című tanulmány az IWGSC búza referencia genom cikkgyűjteménye részeként jelent meg a Science Advances folyóiratban. A cikk vezető társszerzői: Juhász Angéla, Tatiana Belova, Rudi Appels és Odd-Arne Olsen. Szintén társszerző az MTA ATK Mezőgazdasági Intézet két kutatója, Gell Gyöngyvér és Birinyi Zsófia.

A DWARF14 fehérjecsalád által mediált jelátvitel szerepe a növények fejlődésében és stresszadaptációjában

Régi megfigyelés, hogy erdőtüzek, vagy tarlóégetés után gyorsan, szinte robbanásszerűen hajtanak ki a túlélő növények, valamint a talajban elfekvő magvak is csírázásnak indulnak. A tűz tehát a romboláson túl épít is: több olyan ökoszisztéma ismert világszerte, amelyek életében a rendszeresen előforduló tüzek meghatározó jelentőséggel bírnak, mivel a tűz után visszamaradó táj egyben egy új kezdete is, ahol vetélytársak nélkül, tápanyaggal bőségesen ellátott talajon indulhat újra a vegetáció fejlődése. A kaliforniai chaparral, a mediterrán macchia, az ausztrál kwongan, vagy a dél-afrikai fynbos vegetációtípusok alkalmazkodtak leginkább a rendszeres tüzekhez, ugyanis az itt élő fajok jó része csak a tűz után hajt ki vagy kezd el csírázni. Sokféle elmélet van arról, hogy melyik az a faktor (hőhatás, gázok, tápanyagok koncentrálódása, füstben található anyagok stb.), amelyik a magvak robbanásszerű csírázását előidézi. 2004-ben ausztrál, valamint dél-afrikai kutatóknak párhuzamosan sikerült azonosítaniuk azt a vegyületet, mely a füstből a talajba oldódva – akár több száz kilométernyi sodródás után – elindítja az akár évekig a talajban elfekvő magvak csírázását. A butenolid típusú, karrikinnek elnevezett vegyületcsoport tagjai egy ismeretlen jelátviteli mechanizmus aktiválásával fejtik ki hatásukat, ráadásul nemcsak az ún. fire-prone társulások fajaiban, hanem modell- és gazdasági növényekben is. A karrikinet leíró, Johannes van Staden vezette dél-afrikai csoporttal együttműködve 2006-ban kezdtük el vizsgálni a füst extrakt („füstvíz”), valamint a tiszta hatóanyag (KAR₁) génexpresszió változására kifejtett hatását azért,

hogy felderítsük a karrikinék molekuláris hatásmechanizmusát. Az első globális transzkriptom analízist (microarray) füsttel és karrikinnel kezelt kukorica magvakkal és fiatal magoncokkal végeztük el. A karrikinék nemcsak a csírázást, hanem a csíranövények vigorát is pozitívan befolyásolták, és a kezeléssel a fehérjék ubiquitin-függő proteolízisében szerepet játszó utak aktiválódtak (Soós et al., 2009; Soós et al., 2010). Fotoblasztikus, tehát a csírázáshoz fény igénylő salátafajta („Grand Rapids”) vizsgálatakor kiderült, hogy a karrikin kezeléssel helyettesíti a csírázás vörös fény igényét. Egy következő kísérletben így egy általunk tervezett, saláta cDNS-könyvtár alapú microarray segítségével arra kerestük a választ, hogy a karrikinék a fitokróm jelátvitelt megkerülve miként képesek a csírázás indukciójára (Soós et al., 2009; Soós et al., 2010, Soós et al., 2012). Az eredmények arra utaltak, hogy a karrikinék egy alternatív útvonalon, vörös fény hiányában a HY5-on keresztül, fény indukált gének expressziójának fokozásával (ELIP, TIP stb.) képesek a csírázást beindítani. A karrikin-fitokróm jelátvitel interakciójára utal az is, hogy a karrikinék hatása távoli vörös fényvel revertálható.

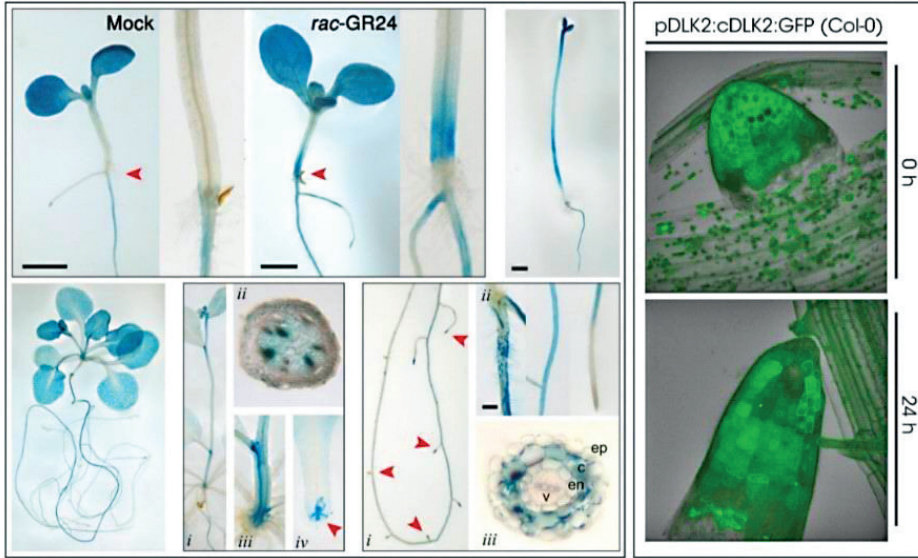
Régóta ismert, hogy a füstvíz hígítatlanul nemhogy növeli, hanem csökkenti a csírázási arányt. Dél-afrikai partnereink megtalálták azt a karrikinékhez nagyon hasonló anyagot a füstben, amely inhibitorként gátolja a csírázást. Kísérleteink szerint a TMB nevű butenolid típusú vegyület 10 μM feletti koncentrációban antagonisztikus hatása a karrikinékkel, ám azokkal ellentétben hatása vizes mosással megszüntethető, és a TMB-gátolt magok csírázásra bírhatóak (Soós et al., 2012). A TMB hatása vörös fény kezeléssel nagyrészt ellensúlyozható, kis koncentrációban pedig karrikin kezeléssel is visszafordítható. Úgy találtuk, hogy a karrikin kezeléssel indukált gének jó része represszálódik TMB kezelés után, ami antagonisztikus interakcióra utal. Farmakológiai kísérleteink nem igazolták ezt a feltevést, hanem egymás ellen ható, de párhuzamos jelátviteli mechanizmusra utaltak. A füstben együttesen jelenlévő, csírázást gátló és serkentő kémiai anyagok ökológiai jelentősége egyelőre ismeretlen. A TMB a tűz után nagy, gátló koncentrációban található meg a talajban, míg a karrikinék jóval kisebb mennyiségben vannak jelen, ahogy azt a dél-afrikai Drakensberg hegységben, ellenőrzött körülmények között leégetett, ún. „highveld” vegetációban végzett *in situ* kísérleteink is igazolták (Ghebrehiwot et al., 2013). A TMB jó oldhatósága, kis affinitása a kötő fehérjékhez azt eredményezi, hogy a tüzet követő esőzés könnyen kimossa, így a nehezebben oldható, a karrikin specifikus jelátvitelt korán beindító karrikinék indukálni tudják a csírázást. A TMB - karrikin antagonizmus tehát egyfajta esőszenzorként is funkcionál, amellyel a fire-prone társulások fajtái képesek optimalizálni és az esőhöz igazítani a csírázási idejüket.

A karrikin-indukált transzkriptom elemzése során feltűnt, hogy a fitokróm rendszerhez, valamint a csírázás során megfigyelhető metabolikus átrendeződéshez köthető géneken túl egy ismeretlen α/β -hidroláz kódoló gén expressziója is

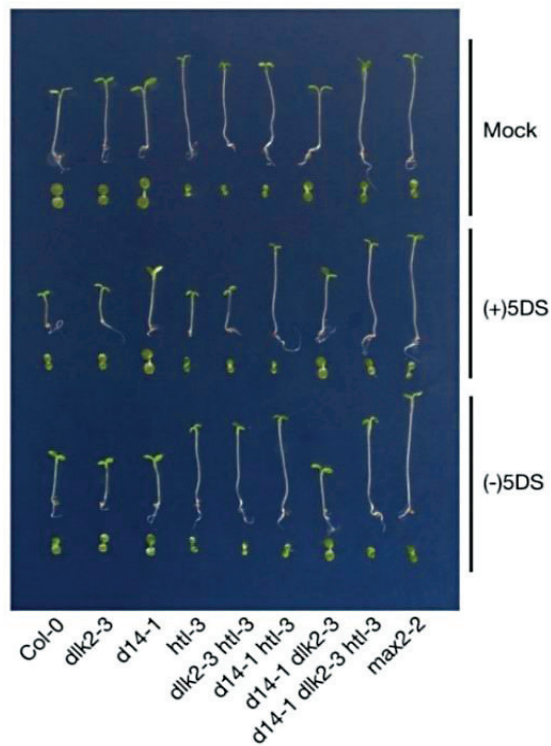
megnőtt. A bioinformatikai elemzés rávilágított, hogy a gén a DWARF14 családba tartozik, a család két tagjának, a DWARF14 (D14) és KARRIKIN INSENSITIVE2 (KAI2) génnek a paralógja, így elnevezése DWARF14-LIKE2 (DLK2) lett (Soós et al., 2009; Soós et al., 2010). Eközben ausztrál kollégáink kimutatták, hogy a karrikinok és az újonnan felfedezett növényi hormonok, a strigolaktonok közötti szerkezeti hasonlóságot alapul véve megoldható a karrikin-indukált jelátvitel problémája, ugyanis az említett D14 fehérje a strigolaktonok receptora. A SL-ok a növényi architektúrára hatnak, a deficiens mutánsok sűrűn elágaznak, törpék, nem alkalmasak mikorrhiza-kapcsolatra. A SL molekula egy triciklikus lakton vázból (ABC gyűrű), valamint az ehhez enol-éter kötéssel kapcsolódó butenolid származékból (D gyűrű) áll, mely nagyon hasonlít a karrikinok és a TMB szerkezetére. Jelátvitelének alapja több fitohormon jelátviteléhez hasonlóan egy olyan útvonal, melyben miután a receptor köti a jelmolekulát, a receptorfehérje kölcsönhatásba lép egy SCF fehérjekomplex F-box komponensével, így a komplex ubiquitinál, azaz degradációra jelöl ki egy célfehérjét. A SL jelátvitelben a receptor fehérjék az α/β -hidroláz fehérjék családjába tartoznak, melynek tagjai igen sokféle funkcióval rendelkezhetnek. Az elsőként leírt strigolakton receptor fehérje a D14, mely hiányában a növény alacsony és sűrűn elágazó fenotípust mutat. A D14 nem szokványos hormonreceptor, a SL molekula aktív formájának létrehozásához első lépésben ő maga hidrolizálja az inaktív ABCD gyűrűből álló molekulát, így létrehozva az immár aktív CLIM (covalently linked intermediate molecule) egységet. Miután kialakul az aktív molekula, a D14 fehérje konformáció változáson esik át, így összekapcsolódhat az SCF^{MAX2} fehérjekomplex F-box komponensével, a MAX2 fehérjével. SL jelenlétében az interakció kialakulása révén az SCF^{MAX2} komplex ubiquitinálja az SMAX1-LIKE (SMXL) fehérjecsalád egyes tagjait (SMXL6, 7 és 8). Az SMXL fehérjecsalád 8 tagból áll, transzkripciók ko-represszorok, degradációjuk révén megszűnik egyes gének átírásának gátlása, aminek következtében a növény fenotípusa megváltozik.

A DWARF14 fehérjének Arabidopsisban két ortológja van: a KAI2 és a már említett DLK2. A KAI2 kiemelt szerepet játszik a fényválasz kialakításában, a csírázás és a levélmorfológia szabályozásában, valamint a hipokotil megnyúlásában. A KAI2 fehérje receptora a szintetikus strigolaktonok egy csoportjának (-5DS), de különös módon a karrikinok percepciójáért is felelős, ugyanis a *kai2* mutánsok nem csíráznak KAR₁ jelenlétében. A füstben található butenolid típusú, csírázás aktív molekulák a KAI2 egy ez idáig azonosítatlan endogén ligandját utánozva (ligand mimics) képesek indukálni a csírázást. A karrikin molekulák így nemcsak fire-prone társulások fajainak, hanem több más növényfaj magjának csírázását is serkentik. A KAI2 emellett elengedhetetlen a növény - gomba szimbiotikus kölcsönhatás kialakításához, mivel a rizs *hebiba* mutánsa nem képes mikorrhizát kialakítani. A KAI2 és a D14 fehérjék közös evolúciós eredete alapján számos hasonlóság fedezhető fel a funkciót

illetően, viszont jelentős különbségnek számít az eltérő ligand-specificitás és a növények fejlődésére gyakorolt hatásuk. Az evolúció során a *KAI2* egy génduplikációs eseményen esett át, amely a *D14* klád kiválását eredményezte. A *D14* útvonal a kanonikus strigolakton-ligandot érzékeli és mind evolúciósan, mind fiziológiásan eltér a *KAI2* kládtól. Jelenleg a *KAI2* szerepe bizonytalan a karrikinek jelátviteli mechanizmusában, de egyértelműnek tűnik, hogy a *D14* és a *KAI2* különböző szerepeket töltenek be a növények fejlődése során, és ez szigorúan a *MAX2* által szabályozott fenotípusok függvényében valósul meg. A *MAX2* ugyanis integrálja a *D14* és a *KAI2* felől érkező szignálokat, így a *max2* mutánsok fenotípusa egy ún. kompozit fenotípus, melyben a *d14* és a *kai2* mutánsok jellegzetességei egyaránt megjelennek. Genetikai bizonyítékok arra utalnak, hogy a *KAI2* a *D14* fehérjéhez hasonlóan a *MAX2*-n keresztül az *SMXL* fehérjecsald tagjainak degradációra való kijelöléséért felelnek. A harmadik paralóg a *DLK2* fehérje, amely evolúciós értelemben a fehérjecsald legfiatalabb tagja, a *D14* génduplikációs eseményét követően következett be a *DLK2* szubklád kiválása. Jelenleg kevés információval rendelkezünk a fehérjéről, nem ismert az élettani hatása és még nincs kijelölt szerepe a butenolid jelátvitelben. Az eddigi ismereteink alapján kijelenthetjük, hogy nem funkcionál strigolakton receptorként, *MAX2* fehérjével nem lép kölcsönhatásba és nem továbbítja sem a strigolakton, sem a karrikin szignált; a *dlk2* mutáns csíranövényeken nem figyelhető meg mutáns fenotípus, strigolakton mutánsokkal ellentétben normális csírázást, fotomorfogenezist és elágazó fenotípust mutatnak (Végh et al., 2017; 8. ábra). A fehérje növényen belüli lokalizációjának feltérképezése során bizonyossá vált, hogy szerepe lehet a gyökér fejlődésében, fiatal gyökérben főleg a gyökérsüveg körül, a merisztéma sejtekben, illetve a cortexben fordul elő, jelenléte a gyökér növekedésével párhuzamosan, kimondottan csak a differenciálódó régióban tapasztalható. Arabidopsis csíranövényekben fokozott *DLK2* expresszió tapasztalható strigolakton és karrikin kezeléseket követően (9. ábra), a *D14* és/vagy a *KAI2* útvonalon keresztül, emiatt a *DLK2* expresszió mint strigolakton és karrikin markergén használható, bár a fehérje butenolidok általi transzkripciós szabályozása ez idáig nem tisztázott. Ismeretes továbbá, hogy a *DLK2* normál expressziója nagymértékben függ a *MAX2* és *KAI2* fehérje aktivitásától, expressziója megnövekszik KAR_1 expozíciót követően, ami utal arra is, hogy *KAI2*-függő jelátviteli úton történik a fehérje szabályozása és szerepe lehet az endogén *KAI2* szubsztrát metabolizmusában.



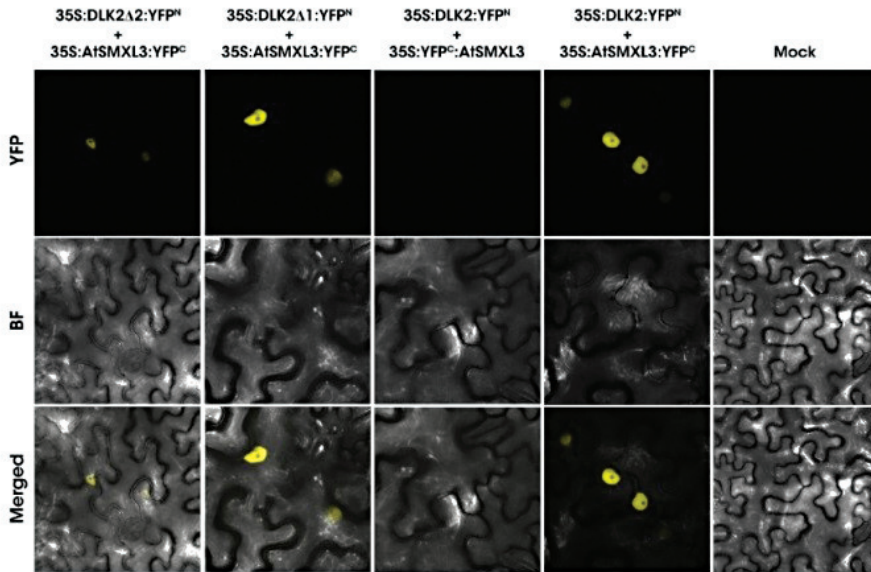
8. ábra. A DWARF14 család tagjaiból képzett mutáns kombinációk fenotípusa Arabidopsisban



9. ábra. A DLK2 lokalizációja

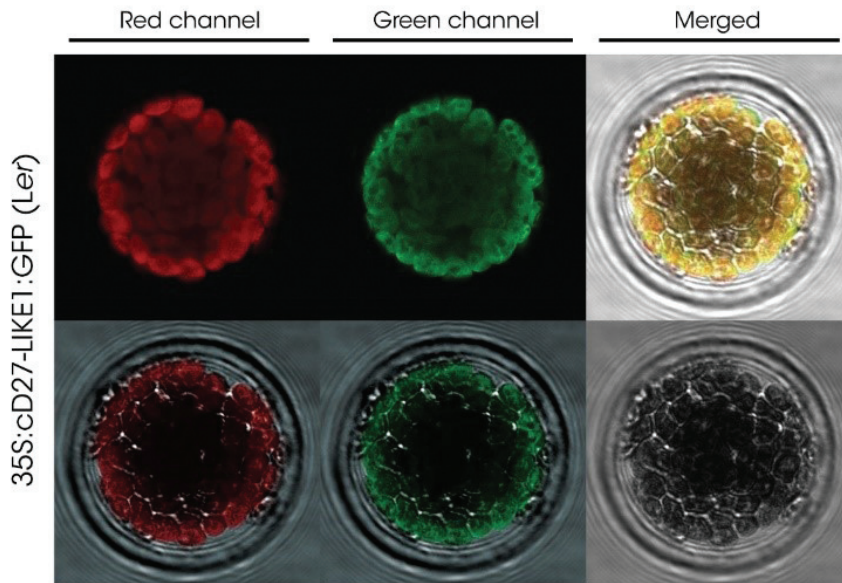
A *dlk2* mutánsok mezokotilja sötét hatására hosszabb a vad típusénál, azaz a DLK2 fehérjének szerepe lehet a fényregulációban is. A sötét adaptáció fokozza a *DLK2* expressziót, mely *pifQ* mutánsokban nincsen, jelezve, hogy fényregulációval, PIF fehérjéken keresztül szabályozza a *DLK2* transzkripciót (Végh et al., 2017).

A MAX2 fehérjén „túl” a strigolakton/karrikin jelátvitel komplexitása tovább növekedik az SMXL család részvétele miatt. Az SMXL fehérjecsalád nyolc tagja evolúciósan három kládba sorolható, az első kládot az SMAX1 és SMXL2 fehérjék alkotják, ezek degradációja a KAI2 fehérjétől függ. A második kládba a már említett SMXL6, 7 és 8 fehérjék tartoznak, melyek degradációja strigolaktonok jelenlétében a D14-SCF^{MAX2} komplexen keresztül történik. A harmadik klád SMXL3,4 és 5 fehérjei nem reagálnak karrikinre, és strigolaktonokra sem. Feltehetően redundánsan töltik be funkciójukat, hiszen a három fehérje mutációja önmagában fenotípusosan nem hat, ám dupla mutánsok esetében a fiatal növények gyökere jóval fejletlenebb, mint a vad típusoké, illetve többféle növekedéskorlátozó gátlás figyelhető meg rajtuk. A három fehérje együttes hiánya letális. Feltételezhető, hogy ha a DWARF14 és az SMXL család koevolúciója létrehozta az említett funkcionális kölcsönhatásokat, akkor a DLK2 és az SMXL3,4,5 között is lehet interakció. Ezt BiFC kísérletekkel igazoltuk, azonban a kölcsönhatás fiziológiai jelentősége még nem tisztázott, mivel a fehérje partnerek csak bizonyos körülmények között ko-lokalizálódnak (10. ábra). Ilyen eset pl. a fejlődő laterális gyökerek csúcsa, a szállítószövet-rendszer, vagy éppen az endofita gombákkal (*Piriformospora indica*) kolonizált gyökerek.



10. ábra. A DLK2 és az SMXL3 interakciója *N. benthamiana* levelekben (BiFC)

A strigolakton/karrikin jelátvitel és kapcsolt részeik a növényi élet számos aspektusát érintik, az egyszerű fejlődési folyamatoktól kezdve a stresszadaptáció kialakításán át, a mikorrhiza kapcsolatokig bezárólag. Látható azonban, hogy még korántsem ismert a DWARF14 család működésének pontos mechanizmusa. Sok a kérdőjel a strigolakton bioszintézis körül, a KAI2 endogén ligandjáról pedig még feltételezések sincsenek. A DWARF14 - SMXL család analógiájára redundancia és komplexitás figyelhető meg a strigolakton bioszintézisben szerepet játszó gének esetében is. A D27 fehérje katalizálja a β -karotin – 9-cisz- β -karotin izomerizációt, a strigolakton bioszintézis kezdő lépését, amely így verseng az ABA és a karotenoid típusú pigmentek bioszintézisével. Kutatásaink során azonosítottunk egy oxidatív stressz által indukált, ismeretlen árpa gént (*HvD27-like*), amely bioinformatikai elemzések alapján nagyfokú hasonlóságot mutat a rizs DWARF27 (*D27*) génnel és egy nem karakterizált *Arabidopsis* génnel (*AtD27-LIKE1*). Az összetett élettani-biokémiai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy az *AtD27-LIKE1* a kloroplasztiszban lokalizált (11. ábra) karotinoid bioszintézisben játszik szerepet és nagyban hozzájárul a növények fénystressz ellenállóságának kialakulásához.



11. ábra. A *AtD27-LIKE1* fehérje a kloroplasztiszban lokalizálódik (CLSM kép)

A *D27-LIKE1* fontos szerepet játszik árpában az ABA-függő abiotikus stresszrezisztencia kialakításában. Az árpa nélkülözhetetlen az emberiség számára az élelmezésben, a takarmányozásban és az iparban betöltött szerepe miatt. Az éghajlatváltozás következtében egyre inkább ki van téve a különböző abiotikus

stresszhatásoknak, különösen a szélsőséges hőmérsékletnek és vízellátásnak, melyek a közép-európai térségben is előfordulnak. Az abiotikus stresszválaszban számos gén vesz részt, melyek ismerete kulcsfontosságú ahhoz, hogy megismerjük a növényekben zajló folyamatokat stressz-körülmények között.

Jelentősebb publikációk

- Éva C, Szőke-Pázi K, Makai S, Gell G, Fábíán A, Poczkodi E, Juhász A (2018): In vivo DNA affinity purification and histone deacetylase inhibitor treatment proves the role of histone acetylation in the expression regulation of high-molecular-weight glutenin genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 36(5-6):750-763.
- Gell Gy, Kovács K, Veres G, Korponay-Szabó I, Juhász A (2017): Characterization of globulin storage proteins of a low prolamin cereal species in relation to celiac disease. *Sci Rep.* 7:39876, doi: 10.1038/srep3987
- Juhász A, Belova T, Florides CG, Maulis C, Fischer I, Gell G, Birinyi Z, Ong J, Keeble-Gagnère G, Maharajan A, Ma W, Gibson P, Jia J, Lang D, Mayer KFX, Spannagl M, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Tye-Din JA, Appels R, Olsen O-A (2018): Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Science Advances* 4:eaar8602
- Juhász A, Makai S, Sebestyén E, Tamás L, Balázs E (2011): Role of conserved non-coding regulatory elements in LMW glutenin gene expression. *PLoS One* 6:e29501.
- Makai S, Éva C, Tamás L, Juhász A (2015): Multiple elements controlling the expression of wheat high molecular weight glutenin paralogs. *Functional and Integrative Genomics.* 15(6):661-72.
- Makai S, Tamás L, Juhász A (2016): A catalog of regulatory sequences for trait gene for the genome editing of wheat. *Frontiers in plant science* 7:1504.
- Soós V, Sebestyén E, Juhász A, Pintér J, Light ME, Van Staden J, Balázs E (2009): Stress related genes define essential steps in the response of maize seedlings to smoke water. *Functional and Integrative Genomics.* 9: 231-242
- Soós V, Sebestyén E, Juhász A, Szalai G, Tandori J, Light ME, Kohout L, Van Staden J, Balázs E (2010): Transcriptome analysis of germinating maize kernels reveals substantial differences between the effects of smokewater and the active compound KAR1. *BMC Plant Biology* 10: 236.
- Soós V, Sebestyén E, Posta M, Kohout L, Light M E, Van Staden J, Balázs E (2012): Molecular aspects of the antagonistic interaction of smoke-derived butenolides on the germination process of Grand Rapids lettuce (*Lactuca sativa*) achenes. *New Phytologist* 196(4):1060-1073.
- Ghebrehiwot H M, Kulkarni MG, Szalai G, Soós V, Balázs E, Van Staden J (2013): Karrikinolide residues in grassland soils following fire: Implications on germination activity. *South African Journal of Botany*, 88: 419-424.
- Végh A, Incze N, Fábíán A, Huo H., Bradford K J, Balázs E, Soós V (2017): Comprehensive analysis of DWARF14-LIKE2 (DLK2) reveals its functional divergence from strigolactone-related paralogs. *Frontiers in Plant Science* 8:1641.