

## **Cím: Az ozmotikus stresszválasz szabályozása magasabbrendű növényekben.**

### **Célok**

A magasabbrendű növényekben a környezeti hatásokhoz való alkalmazkodás egy bonyolult, jelátviteli rendszer szabályozásával valósul meg. A szárazság, hideg, vagy só stresszre adott válasz több fontos eleme ismert már, de a teljes rendszer még nem ismert. A jelen kutatási programban az ozmotikus stressz jelátvitelt, az azt befolyásoló egyéb környezeti hatások, hormonok, illetve a jelátvitelben szerepet játszó faktorok szerepét kívántuk tanulmányozni. Célunk volt, hogy új genetikai módszerek alkalmazásával a stressz jelátvitel további komponenseit tudjuk azonosítani. Egy promoter-riporter gén transz aktivációs rendszer kidolgozásával eddig ismeretlen szabályozó faktorokat kívántunk azonosítani és jellemezni. A transzaktivációs mutagenézis segítségével domináns funkciónyeréses mutáns fenotípus alapján akartuk azonosítani a szabályozásban résztvevő géneket.

### **Feladatok**

2004:

Stressz indukált gének illetve promoterek azonosítása.

Promoter-riporter gén konstrukciók elkészítése.

Promoter csapda rendszerben azonosított indukálható génfúziók jellemzése.

2005:

A stressz indukált gének, génkonstrukciók további jellemzése.

A transz aktivációs rendszer tesztelése, alkalmazása.

A cDNS könyvtár elkészítése növényi expressziós vektorban.

2006:

A transz aktivációs mutagenézis aktivátor vektor vagy cDNS könyvtár alkalmazásával.

A mutánsok előzetes jellemzése.

## Eredmények

### 1) Stressz indukált gének illetve promoterek azonosítása és jellemzése.

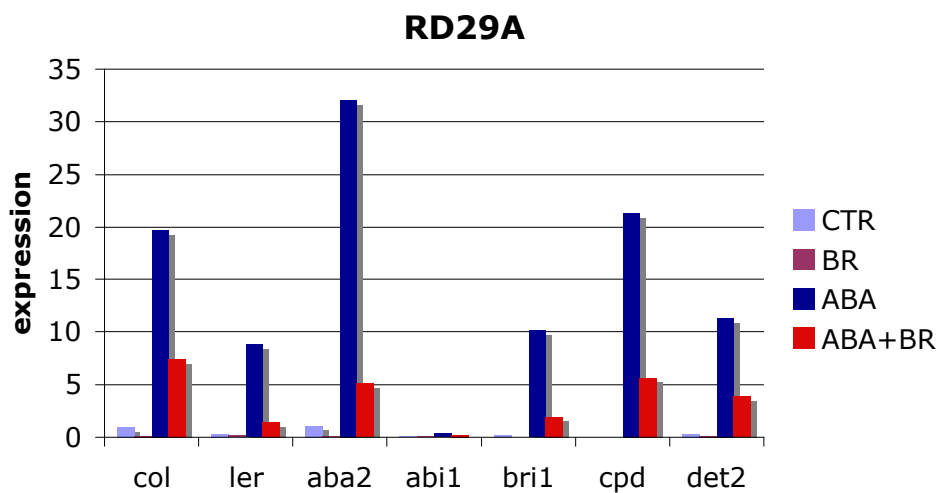
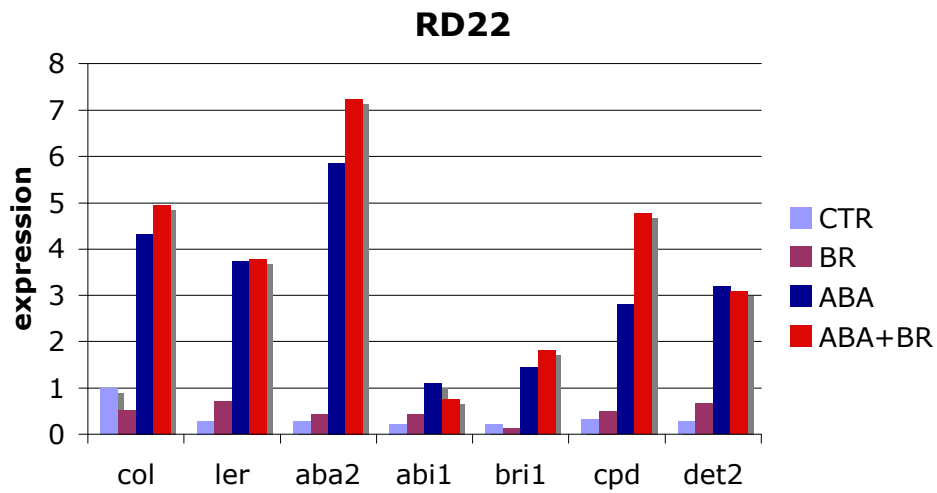
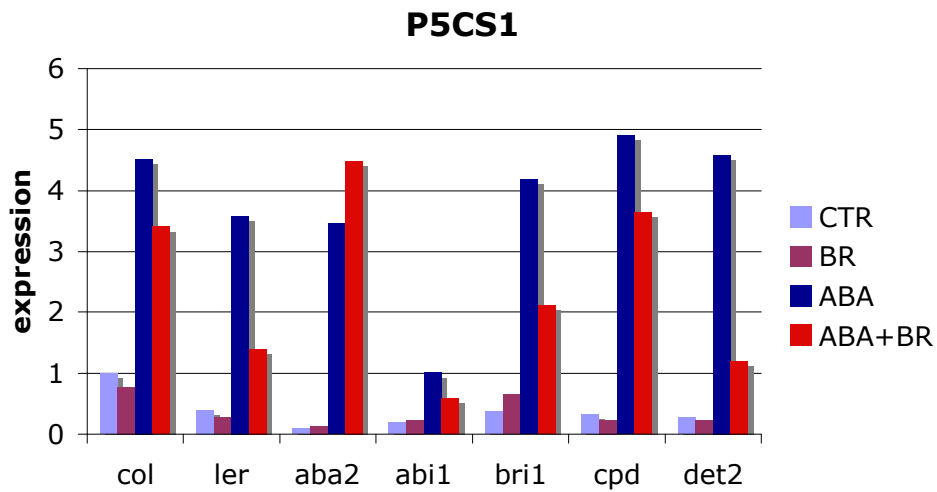
A kísérleti rendszerünkhöz fontos volt olyan stressz indukált géneket azonosítani, amelyek egyrészt teszt géneként alkalmazhatóak a különböző gének, mutánsok, transzgenikus növények vizsgálata során, másrészt alkalmasak stressz indukált promoter-riporter gén konstrukciók előállítására.

Irodalmi adatok és saját korábbi munkánk eredményei alapján kiválasztottunk több olyan *Arabidopsis* gént, amelyek stresszfüggő aktivációt mutatnak (1. Táblázat). A gének átírt szakaszára génspecifikus PCR primereket terveztünk, hogy kvantitatív RT-PCR segítségével tanulmányozhassuk a transzkripció aktivitás változását különböző körülmények között. A szabályozási mechanizmusok tanulmányozása érdekében a stressz kezelések mellett a különböző hormonok elsősorban az ABA és brasszinoszteroid (BR) hatását, illetve kölcsönhatását is vizsgáltuk.

Gén specifikus PCR primer párokat terveztünk a vizsgálatokba bevont gének átírt szakaszaira. RNS-t izoláltunk 2 hetes, különféle kezeléseknél kitett *Arabidopsis* növényekből (NaCl, ABA, brasszinoszteroid, mannitol, glükóz, stb.). Az egyes gének expressziós szintjeit kvantitatív PCR reakcióval (Q-PCR) Sybergreen detektálási módszert alkalmazva határoztuk meg.

1. táblázat. A stresszindukált *Arabidopsis* gének transzkripció analízise. A Q-PCR vizsgálatokba bevont gének listája.

Gén	TAIR no.	Fehérje
ADH1	At1g77120	alcohol dehidrogenase
P5CS1	At2g39800	pyrrolin-5-carboxilate synthase 1
P5CS2	At3g55610	pyrrolin-5-carboxilate synthase 2
RD29A	At5g52310	low-temperature-induced protein 78
RD22	At5g25610	dehydrin
ERD10	At1g20450	dehydrin
RAB18	At5g66400	dehydrin-like protein

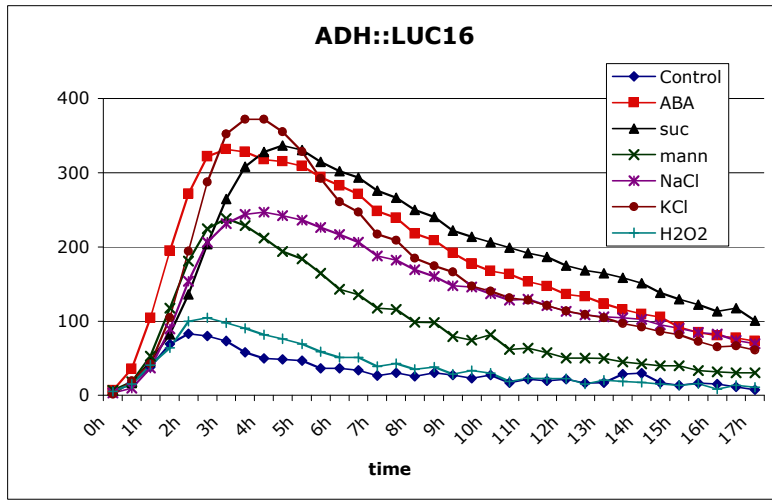
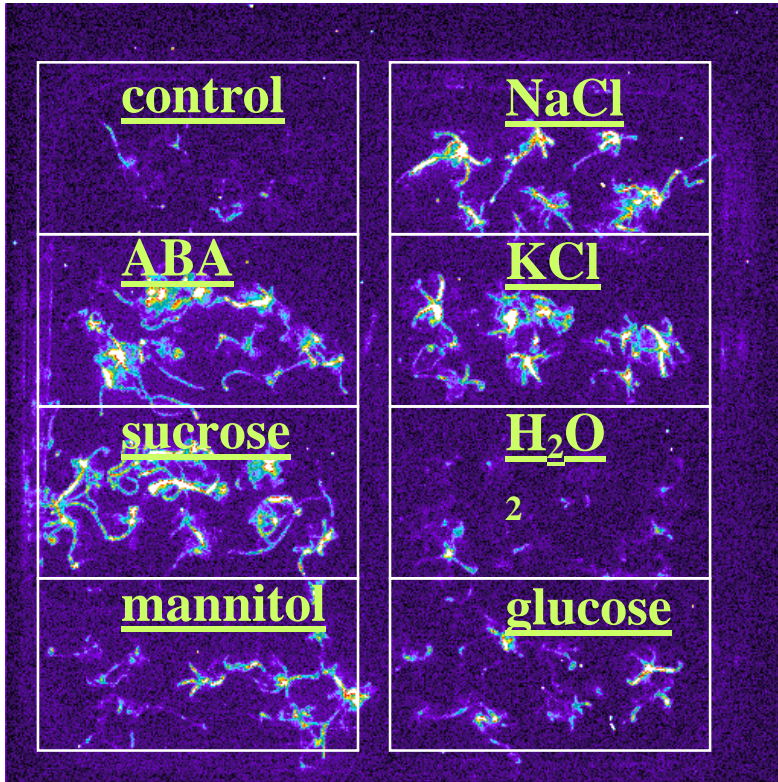


1. ábra. Néhány stressz indukált gén expressziójának vizsgálata. A P5CS1, RD22 és RD29A gének transzkripció aktivitását kvantitatív RT-PCR (Q-PCR) segítségével vizsgáltuk vad típusú Arabidopsis-ban (col, ler), illetve különböző mutánsokban.

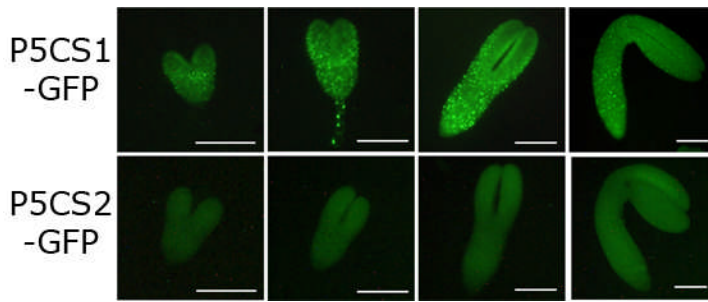
Az 1. ábra a vizsgálatsorozat néhány eredményét mutatja be. Az ábrán látható, hogy az ABA aktiválás illetve a brassinolid hatás eltérően befolyásolja a gének transzkripciós aktivitását. A RD29A gén expressziója 20-30x emelkedett az ABA kezelés után, ami az *abil* mutánsban nem volt detektálható. Brasszinoszteroid előkezelés ugyanakkor 60-80%-al csökkentette az ABA indukciót. A RD22 gén transzkripcióját 4-5x indukálta az alkalmazott ABA kezelés, ami szintén ABI1 függést mutatott. Ellentétben a RD29A génnel, a RD22 aktiválást a brasszinoszteroid kezelés nem befolyásolta. A P5CS1 transzkripciója 4-5x emelkedett meg az alkalmazott ABA kezelés után, és ez szintén ABI1-től függött. A brasszinoszteroid csökkentette ugyan az ABA indukciót, de nem olyan mértékben mint a RD29A esetében. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a három stressz indukált gén az ABA és a BR hatás tekintetében eltérő szabályozás alatt áll. A felsorolt gének transzkripciós aktivitását analizálva megállapítottuk, hogy azok a stressz indukciót mutatnak, de a szabályozásuk némileg eltér egymástól. A jelátviteli mechanizmusok tehát nem egyformán szabályozzák a felsorolt géneket, ezért azok egyedi tesztelése indokolt.

A transzkripciós szabályozás pontosabb tanulmányozása valamint a transz aktiváló faktorok azonosítása céljából izoláltuk a P5CS1, ADH1, RAB18, RD29A és ERD gének 5' promoter régióit, és azt a szentjános bogárból származó luciferáz (Ffluc+) riporter génhez kapcsoltuk. Az elkészített promoter-riporter gén konstrukciókat *Arabidopsis* növénybe jutattuk *Agrobacterium* transzformáció segítségével. Mélyhűtött CCD kamera segítségével teszteltük transzgenikus növények lumineszcenciáját. A további vizsgálatok céljaira azokat a vonalakat válogattuk ki, amelyek minimális alap aktivitást és erős stressz illetve ABA indukciót mutattak. A 2. **Ábra** az ADH1-LUC génkonstrukció analízisét mutatja be. Látható, hogy a gén konstrukció alap aktivitás sokszorosára emelkedik különböző stressz kezelése hatására. A CCD kamera automatikus üzemmódja időbeni analízist is lehetővé tesz, aminek köszönhetően a génműködés kinetikája is tanulmányozható (2B. ábra).

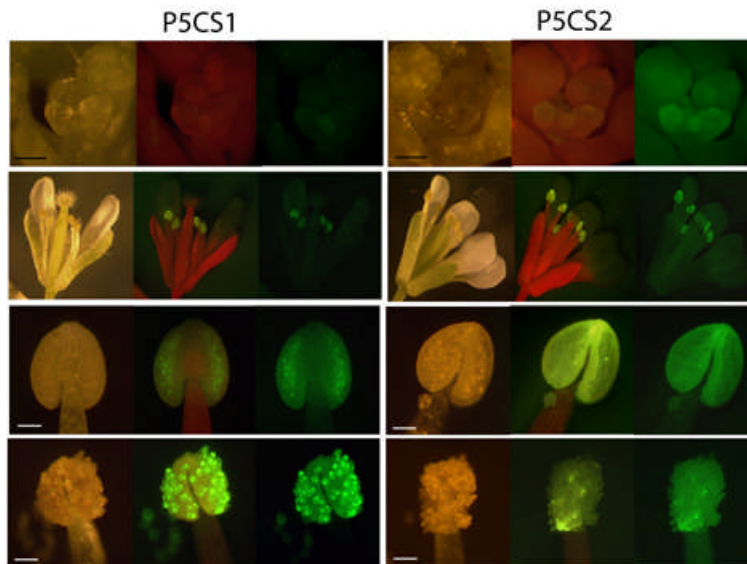
A P5CS1 és P5CS2 génekkel zöld fluorescens protein (GFP) fúziókat is készítettünk, hogy a génműködés szabályozásának további lépéseit illetve a sejten belüli lokalizációt is tanulmányozhassuk. Megállapítottuk, hogy a P5CS1-GFP és a P5CS2-GFP bizonyos hasonlóságok mellett eltérő expressziós mintázatot ad. Habár mindkét gén működik a fejlődő embriókban, a P5CS1-GFP-ra apró foltokból álló fluoreszcencia volt jellemző, míg a P5CS2-GFP egyenletes fluoreszcenciát mutatott (3. **ábra**). Virágzatban a P5CS1-GFP fluoreszcenciája inkább a pollen szemekre volt jellemző, míg a P5CS2-GFP erős expressziót mutatott a virág merisztémában a hajtáscsúcsokhoz közeli szövetekben, valamint a porzó falában (4. **ábra**).



2. ábra Az ADH1-LUC génkonstrukcióval transzformált Arabidopsis növények által kibocsájtott biolumineszcencia változása különböző stressz körülmények között.



3. ábra. A P5CS1-GFP és P5CS2-GFP génkonstrukciók expressziója Arabidopsis embriókban.

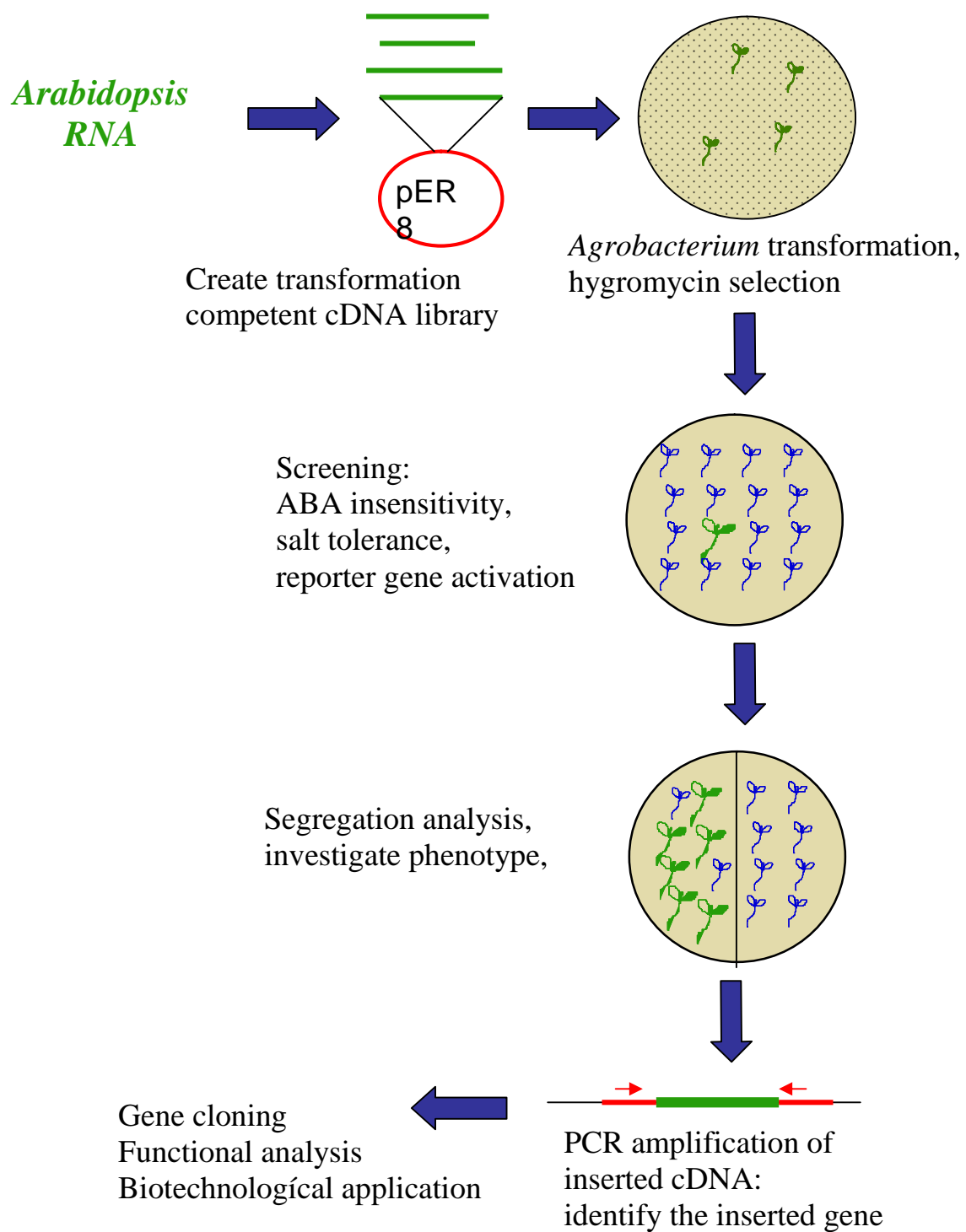


4. ábra. A P5CS1-GFP és P5CS2-GFP génkonstrukciók expressziója Arabidopsis virágzat hajtáscsúcsában, virágban és portokban.

## 2. A transzformálásra alkalmas cDNS könyvtár elkészítése.

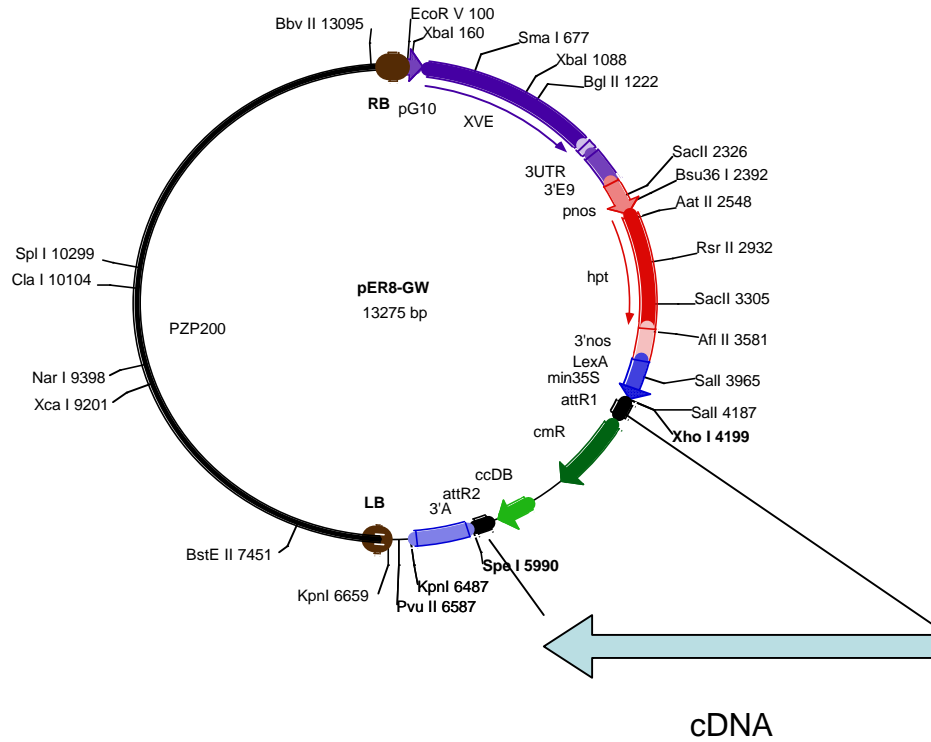
Ahhoz hogy a stressz jelátvitelben új pozitív szabályozó faktorokat azonosítsunk, olyan genetikai rendszer kidolgozását tűztük ki célul, ami lehetővé teszi a pozitív szelekciót, ellenőrzött expresszió alkalmazását és egyszerű, hatékony gén azonosítást. A kísérleti rendszer segítségével elsősorban a pozitív szabályozó faktorok azonosítását akartuk megvalósítani. A kísérleti stratégiát az 5. ábra szemlélteti.

Első lépésként egy olyan Arabidopsis cDNS könyvtárat készítettünk el, ami alkalmas a genetikai transzformációra. Ezt a munkát a Kölni Max-Planck Institut für Züchtungsforschung intézettel közösen, egy nemzetközi kooperáció keretében végeztük el. RNS-t izoláltunk különböző szervekből, és különböző fejlődési állapotban levő növényekből. Kétféle cDNS könyvtárat készítettünk. Az egyik könyvtárhoz 2 és 6 óra 200mM NaCl stresszel kezelt növényekből izolált RNS-t használtunk. A másik könyvtár elkészítéséhez a RNS-t a nem kezelt kontrol növényekből izoláltuk. A cDNS könyvtár elkészítéséhez a Gateway vektor rendszert alkalmaztuk, amely nagy hatékonyságú klónozást tesz lehetővé. Az elsődleges könyvtárat pDONR207 vektorba klónoztuk. Az elsődleges könyvtár számításaink szerint kb. 500 ezer klónból állt. Az expressziós könyvtár elkészítéséhez olyan növényi expressziós vektort alkalmaztunk (pER8-GW), amelyben egy indukálható expressziós kazetta tartalmazta a LR rekombinációs helyet (6. [ábra](#)). Az elsődleges könyvtárból nagyhatékonyságú LR reakció segítségével vittük át a klónokat az expressziós vektorba. A könyvtár ellenőrzése során kiderült, hogy a cDNS átvitel gyakorlatilag 100%-ban sikeres volt, a klónok mindegyike hordozott egy-egy cDNS inszertet (7. [ábra](#)). A rendelkezésünkre álló cDNS könyvtár számításaink szerint több százezer klónt tartalmaz. Mivel az Arabidopsis teljes génállománya 28000 gén, a cDNS könyvtár ennek kb. tízszerese. Ezért nagy valószínűséggel bármilyen génről kódolt cDNS megtalálható ebben a könyvtárban.

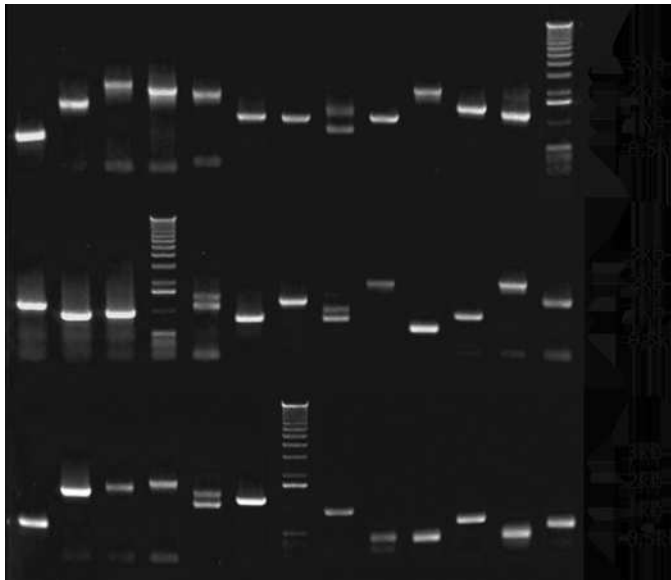


5. ábra. Az Arabidopsis cDNS könyvtár transzformálás és szelekciós stratégia lépései. A domináns fenotípusú transzgenikus vonalak azonosítása után egyszerűen izolálható, azonosítható és klónozható a fenotípusért felelős gén.





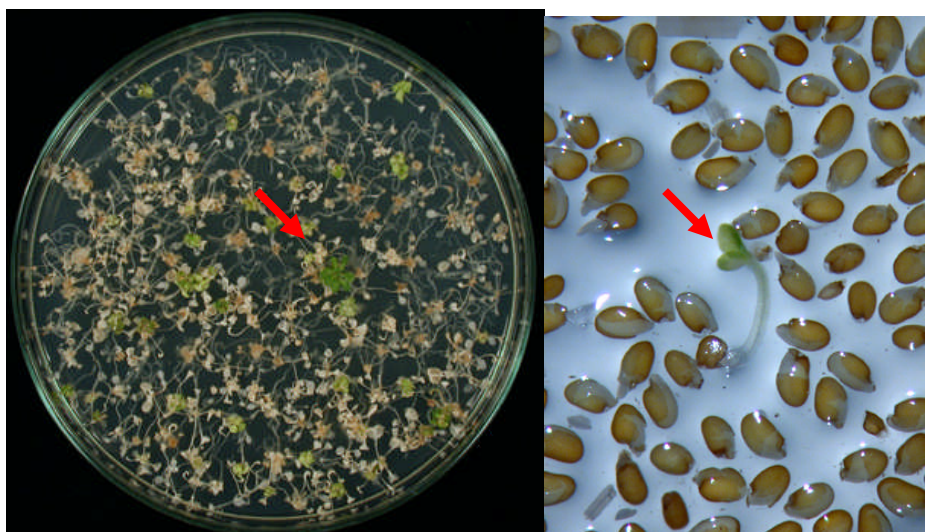
6. ábra. A cDNS könyvtár elkészítéséhez használt pER8-GW expressziós vektor térképe.



7. ábra. A növényi expressziós vektorban létrehozott cDNS könyvtár komplexitásának tesztelése. Ebben a kísérletben 36 véletlenszerűen kiválasztott klónból, vektorspecifikus primerek felhasználásával, PCR segítségével amplifikáltuk az inszerteket. Megfigyelhető, hogy mindegyik klónban eltérő méretű inszert található. Az inszertek 5' és 3' végeinek szekvencia analízise alapján elmondhatjuk, hogy a klónok felében teljes hosszúságú cDNS fragmentek épültek be.

### 3. A cDNS könyvtár transzformáció alkalmazása a stresszválaszt szabályozó gének azonosításához.

Az elkészített cDNS könyvtárral nagy mennyiségű, sok tízezer transzgenikus *Arabidopsis* növényt állítottunk elő és szelektáltunk különféle körülmények között. A só rezisztencia tesztelésére 200mM NaCl és 4  $\mu$ M ösztadiol tartalmú táptalajon vizsgáltuk a 2 hetes higromicin rezisztens csíranövények növekedését, túlélését (8. ábra). Abszcizin sav érzékenységet 2,5  $\mu$ M ABA és 4  $\mu$ M ösztadiol tartalmú táptalajon teszteltük. A csírázó, növekedő, NaCl rezisztens vagy ABA inszenzitív növények higromicin rezisztenciáját teszteltük, majd üvegházban elvirágoztattuk őket, hogy a T2 generációs növényeket tovább vizsgálhassuk. 40.000 növény NaCl szelekciója után 180 túlélő növényről gyűjtöttünk magot, amik közül a másodlagos tesztek során 16 vonalban találtunk megemelkedett NaCl rezisztenciát (2. táblázat). Az ABA szelekciós kísérletben 40 T2 vonalat teszteltünk, és 3 vonalban találtunk csökkent ABA érzékenységet, ahol a csírázást már erősen gátló 2,5-5  $\mu$ M ABA jelenlétében is képesek voltak a magvak csírázni (8. Ábra).



A

B

8. Ábra. In-vitro szelekciós rendszer alkalmazása a só rezisztens és ABA inszenzitív *Arabidopsis* vonalak azonosítása céljából. A bemutatott kísérletben T1 generációs *Arabidopsis* növények NaCl toleranciáját teszteltük 200mM NaCl + 4 $\mu$ M ösztadiol tartalmú táptalajon (A). Az ABA szelekció esetében 2,5  $\mu$ M ABA hormon tartalmú táptalajon csíráztattuk a transzformált növények magvait. A túlélő növényeket (nyílal jelölt) higromicin tartalmú táptalajon teszteltük a vektor marker gén jelenléte szempontjából.

Line	Gene	Protein	cDNA
Col-C38-22	AT3G05050	serine/threonine kinase	full length
Col-C38-33	<u>AT4G14520</u>	RNA polymerase II-subunit 5	full length
Col-C38-75	AT2G45180	lipid binding protein	full length
Col-C38-80	AT5G24990	unknown protein	truncated
Col-C38-182	AT2G30950	ATP-dependent peptidase (VAR2)	full length
Col-C38-168	AT4G22220	mitochondrial scaffold protein (ATISU1)	full length
Col-C38-172	AT4G09570	calcium /calmodulin-dependent protein kinase (CPK4)	truncated
Col-C38-174	At3g22230	putative ribosomal protein L27	truncated
Col-C38-180	AT3G42150	unknown protein	full length
Col-C38-183	AT4G15550	beta-D-glucosyltransferase (IAGLU)	truncated
Col-C38-184	At3g17420	serine/threonine protein kinase	truncated
Col-C38-186	At2g19310	putative small heat shock protein	full length
Col-C38-187	AT3G53740	60S ribosomal protein L36 (RPL36B)	full length
Col-C38-188	AT2G25450	unknown protein	truncated
Col-C38-189	AT1G21310	Extensin (ATEXT3)	truncated
ADH-C38-41	At5g12030	heat shock protein (HSP17.6A)	full length

2. táblázat. A fokozott só rezisztenciát mutató Arabidopsis vonalakban talált inszertek szekvencia analízisével azonosított gének jegyzéke. A cDNS klónok közül 9 teljes hosszúságú volt, 7 klón 5' régiójából hiányzott rövidebb-hosszabb fragment. A legmagasabb szintű toleranciát a Col-C38-33 vonal illetve az ADH-C38-41 vonal mutatta.

#### 4. A NaCl és ABA szelekciós kísérletekben azonosított vonalak analízise.

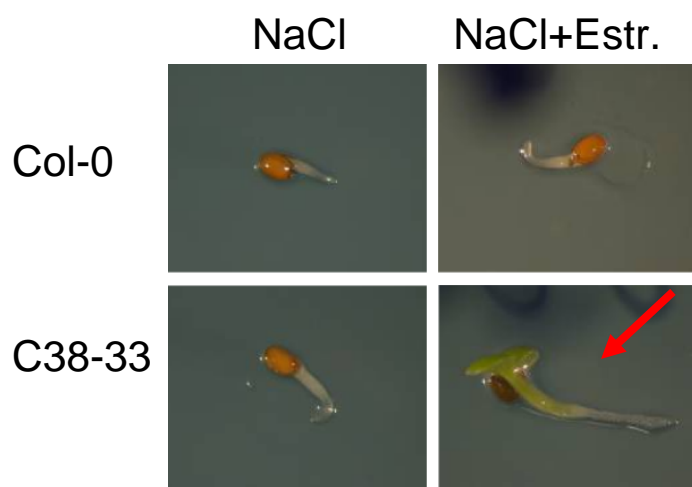
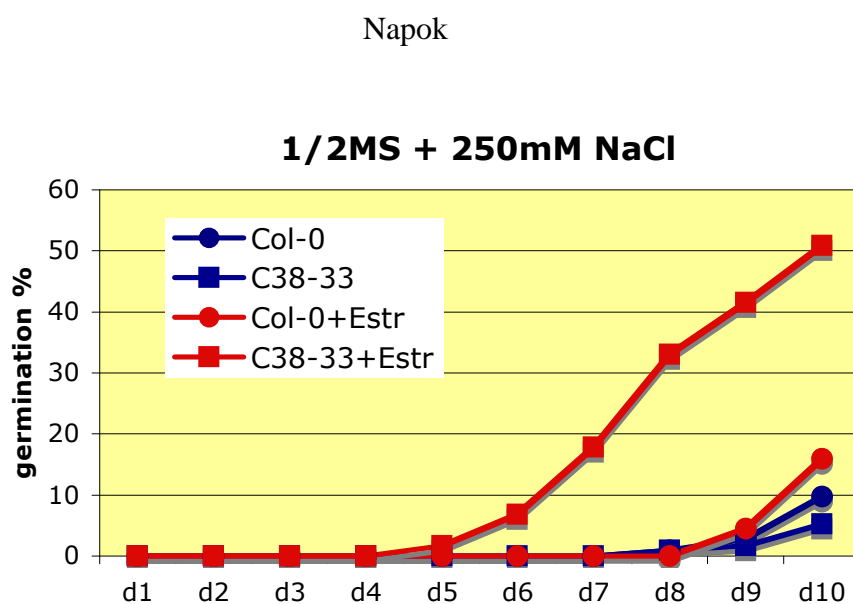
Az azonosított NaCl rezisztens illetve ABA inszenzitív vonalakból PCR segítségével izoláltuk a beépített cDNS klónokat. A PCR fragmentek szekvencia analízise révén információt kaptunk az adott vonalba beépült cDNS-ről, illetve kódolt fehérje természetéről (2. táblázat). Az azonosított gének egy része ismeretlen funkciójú, eddig nem jellemzett gén. Néhány gén esetében már találtunk információt a nemzetközi szakirodalomban, de a stressz érzékenység szempontjából ezeket a géneket illetve kódolt fehérjéket nem jellemezték. Egyedül a C38-41 vonalban azonosított hősokk fehérjével kapcsolatban találtunk utalást arra, hogy a HSP17.6A fehérjének szerepe lehet nem csak a hőstressz során, de, chaperon típusú fehérje lévén, ez a fehérje más stressz típusok esetében is védő hatást fejthet ki.

A legmagasabb szintű rezisztenciával rendelkező vonalak esetében megkezdjük azok részletes élettani illetve molekuláris genetikai analízisét. Teszteltük a só illetve ABA rezisztencia ösztradiol függését (9. ábra). A beépült gén jellemzése céljából teszteltük a cDNS expressziójának változását ABA vagy NaCl és ösztradiol jelenlétében. Megkezdjük a vizsgált gének klónozását, illetve inszerciós mutánsokat szereztünk be a további funkcionális analízis céljaira. A megkezdett munkát jelenleg is folytatjuk. Az alábbiakban két inszerciós vonal illetve gén analízisének előzetes eredményeit mutatjuk be.

#### 5. A C38-33 vonal analízise: egy NaCl rezisztenciát előidéző gén jellemzése.

A C38-33 vonal az ösztradiol jelenlétében fokozott só rezisztenciát mutatott a csírázási tesztekben (9. ábra). Ösztradiol jelenlétében a C38-33 magvak még 250mM NaCl tartalmú táptalajon is képesek voltak a csírázásra, ami egyébként gyakorlatilag teljesen gátolta a vad típusú Arabidopsis növények csírázását. Ösztradiol nélkül viszont nem láttunk különbséget a vad típusú és a transzformált növények só érzékenysége között (9. ábra). Az ösztradioltól függő fenotípus arra utal, hogy az ösztradiol indukálható expressziós kazettát hordozó ER8 vektorba épült cDNS felelős a feltételes stressz rezisztenciáért.

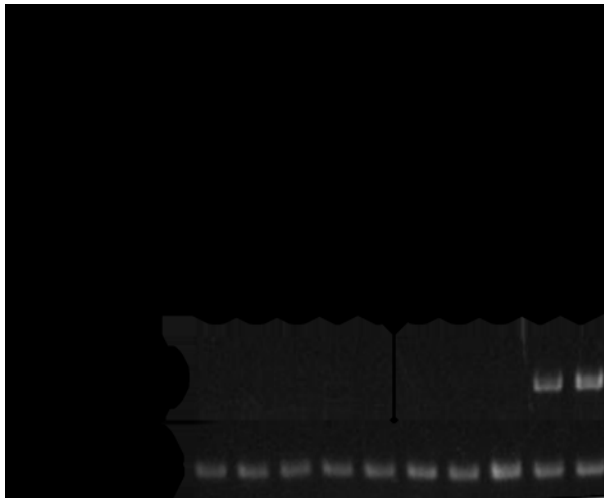
A beépült cDNS fragment azonosítása érdekében egy vektor specifikus primer párral PCR segítségével amplifikáltuk az ER8-ba épült fragmentet. A kapott PCR fragment kb. 0,6 kb volt. A PCR fragment DNS szekvenciájának meghatározása után a BLAST szekvencia homológia kereséssel azonosítottuk a beépült gént. A C38-33 klón esetében egy, a RNS polimeráz 5 alegységhez hasonló fehérjét kódoló gént (AT4G14520) azonosítottunk. A 200 aminosavat tartalmazó fehérje egy S1 domént tartalmaz, ami jellemző a riboszomális S1 proteinekre. Az S1 doménnek az irodalmi adatok szerint az RNS kötésben van szerepe, térszerkezete hasonlít a hideg stressz által aktivált bakteriális fehérjék egy csoportjára jellemző „cold shock domain“-hez (10. ábra). Az Arabidopsis adatbázisban több hasonló szerkezetű fehérjét találtunk, a szekvencia hasonlóság azonban az általunk azonosított és a rokon fehérjék között nem magas.

**A****B**

9. ábra. A C38-33 vonal só rezisztenciájának analízise. T2 generációs magokat csíráztattunk 200mM NaCl illetve 200mM NaCl + 4 $\mu$ M ösztadiol tartalmú táptalajon. A) mikroszkópos felvétel 8 nappal a csírázási teszt kezdete után. B) Csírázási teszt a csírázási képesség mérése céljából. Látható, hogy a Col-0 vad típusú növény csírázását egyformán gátolja a só a kétféle táptalajban. A C38-33 vonalban az ösztadiol jelenlétében jobb csírázási és túlélési képességet tudunk kimutatni. Az ösztadiol függő NaCl rezisztencia egyértelműen bizonyítja az ER8 vektorral a növénybe juttatott cDNS szerepét.



A gén aktivitásának tesztelése érdekében RT-PCR analízissel tanulmányoztuk a *AT4G14520* gén aktivitását a transzformált és vad típusú növényekben. Vad típusú növényben csak nagy nehézségek árán, magas PCR ciklus után (kb. 45) tudtuk a gén transzkriptjét kimutatni. A C38-33 vonalban a *AT4G14520* gén ösztadioltól függő expressziót mutatott (11. **ábra**). Alap állapotban a gén expressziója a vad típusú növényhez hasonlóan lacsony volt, míg ösztadiol adása után több nagyságrenddel megemelkedett, és már 32 PCR ciklus után is kimutatható volt (11. **ábra**).

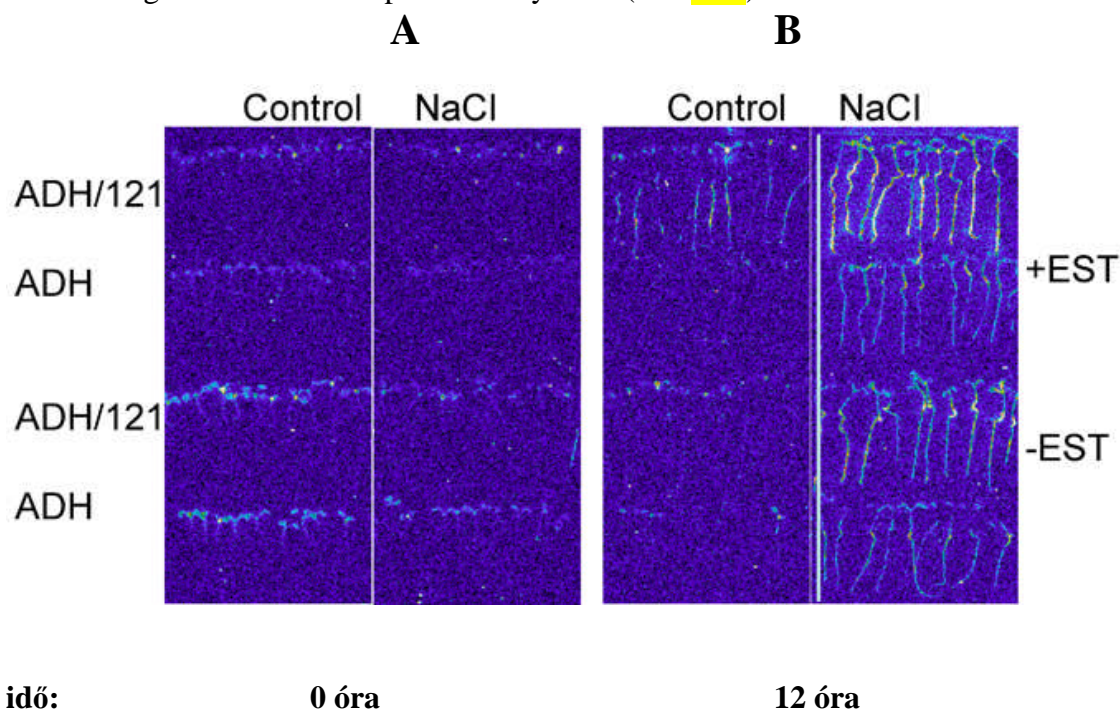


11. ábra. Az *At4g14520* gén expressziójának vizsgálata vad típusú *Arabidopsis* növényekben (Col-0) és a C38-33 vonalban (C33). Látható, hogy a gén transzkriptje 32 PCR ciklus után nem mutatható ki sem a vad típusú, sem a nem kezelt C33 vonal növényeiben. 6 illetve 24 óra ösztadiol kezelés után viszont a gén termék egyértelműen kimutatható a C33 növényekben, a vad típusban viszont nem.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a C38-33 vonalban egy olyan, eddig nem vizsgált, gént sikerült azonosítani, aminek megemelkedett expressziója segíti a magas só jelenlétében a csírázási képességet. A gén klónozását megkezdtük. Rekonstrukciós kísérletekben a *AT4G14520* cDNS-t *Arabidopsis*-ban expresszáltatjuk konstitutív illetve indukálható promoterek szabályozása alatt. Amennyiben a megemelkedett só rezisztenciát sikerül elérni a klónozott génnel is, akkor más növényekben is teszteljük a *AT4G14520* gén hatását.

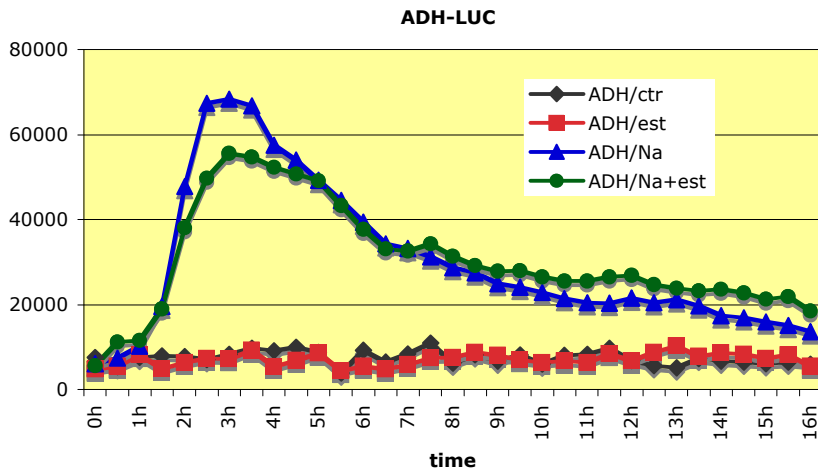
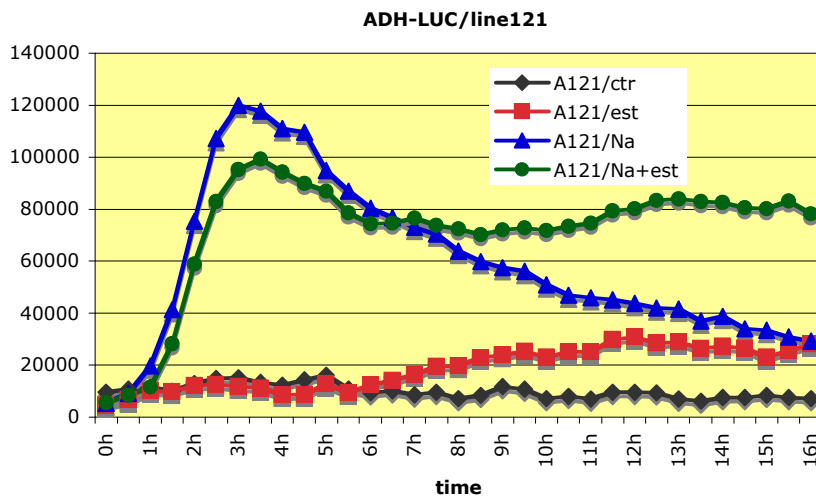
5. A luciferáz riporter génonstruktúrája transz-aktiválása az ADH-121 vonalban. Egy pozitív szabályozó faktor azonosítása.

Az ADH promoter által szabályozott luciferáz riporter gén aktivitása megemelkedik különböző környezeti stressz hatásokra, illetve ABA kezelés után. A kísérleti stratégiánk segítségével olyan faktorokat kívántunk azonosítani, amelyek túltermeltetése a luciferáz riporter aktiválásához vezet, külső indukció nélkül is. A cDNS könyvtár transzformáció után teszteltük a transzgenikus növény populáció lumineszcenciáját és azokat a növényeket szelektáltuk ki amelyekben luciferáz aktivitást találtunk. Az így azonosított növények utódait részletes analízisnek vetettük alá. A 12. ábrán az ADH-121 vonal tesztelését mutatjuk be. A vad típusú ADH-LUC növényeket és az ADH-121 vonal növényeit 1/2MS alap táptalajra illetve 200mM NaCl tartalmú táptalajra helyeztük. A növények egy részét 4 $\mu$ M ösztadiollal kezeltük, és a biolumineszcenciát 12-24 órán keresztül mértük. Az 12. ábrán látható, hogy a biolumineszcencia hasonló szintű a 0 időpontban a vad típusú és a transzgenikus növényekben. 12 óra elteltével a magas sókezelésnek kitett növények lumineszcenciája erősen megemelkedett, míg a kontroll táptalajon változatlan maradt, kivéve az ösztadiol kezelésnek alávetett ADH-121 vonalat, ahol a lumineszcencia szintén magasabb volt a vad típusú növényeknél ( 12. ábra).



12. Ábra. A luciferáz riporter gén segítségével azonosított pozitív szabályozó faktor hatásának analízise. Az ADH1 promoter-luciferáz riporter gén konstrukciót hordozó növényekben megemelkedett biolumineszcencia alapján azonosítottunk egy transzgenikus vonalat (ADH-121), amiben a luciferáz aktivitás ösztadioltól függően emelkedett meg. A szülői ADH-luciferáz (ADH) illetve transzgenikus ADH-121 vonal biolumineszcenciája alacsony szintű a 0 időpontban (A). NaCl tartalmú táptalajon az ADH promoter aktivitása és a biolumineszcencia mindkét vonalban megemelkedik 12 óra elteltével. A kontroll táptalajon a ADH-121 növények biolumineszcenciája ösztadiol permetezés után só kezelés nélkül is megemelkedik, míg a szülői vonal változatlan marad. A só tartalmú táptalajon a ADH-121 vonal aktivitása magasabb a szülői ADH vonalnál.



**A****B**

13. Ábra. Az ADH-LUC riporter génkonstrukció aktivitásának változása só illetve ösztadiol kezelés után az ADH-LUC növényekben (A) illetve a szelektált ADH-LUC/121 vonalban (B). A NaCl kezelés megemeli az ADH-LUC aktivitását, ami 3-4 órával a kezelés kezdete után éri el a maximumát, utána fokozatosan csökken. Az ösztadiol kezelésnek nincs hatása az ADH-LUC aktivitásra a szülői vonalban (A). Az ADH-121 vonalban az ösztadiol kezelés önmagában fokozatosan emeli a biolumineszcencia szintjét, míg sókezeléssel kombinálva stabilizálja a magasszintű expressziót (B).

A luciferáz aktivitás mennyiségi kiértékelése során világossá vált, hogy a só kezeléskor az ADH-LUC gén aktivitása 3-4 órán keresztül növekszik, majd fokozatosan csökken (13. **ábra**). Az ösztadiol kezelés nem módosítja a vad típusú növényi háttérben az ADH-LUC aktivitást, az ADH121 vonalban viszont a luciferáz aktivitás szintje magasan marad. Az ADH-LUC vonalban az ösztadiol kezelés önmagában fokozatos lumineszcencia emelkedést eredményez, míg a szülői növényekben a luciferáz aktivitás nem tér el a kontrol növényekétől. Az ADH121 vonalban az ADH1 promoter aktivitása tehát az ösztadiol adásától függően megemelkedik, vagy magas szinten stabilizálódik.

Az ADH-121 vonalban a szegregációs analízis egy inszert jelenlétére utalt. A PCR amplifikáció egy fragmentet eredményezett. A PCR fragment szekvenciájának analízise során egy AP domén transzkripciós faktort azonosítottunk, ami az EREBP alcsaládba volt sorolható. A RAP2.12 transzkripciós faktor 359 aminosavból áll, a fehérje családra jellemző AP domén a 142 és 187 amino savak közötti régióban található (14. **ábra**). Hasonló domén található a hideg és só stressz válaszban fontos szerepet játszó CBF transzkripciós faktorokban illetve az etilén jelátvitelben fontos EREBP transzkripciós faktorokban. Érdekes, hogy az ADH1 promoter szekvencia analízisének azonosítottunk egy ERE típusú szekvencia elemet, ami más génekben az etilén választ közvetítő EREBP faktorok kötő helye. További vizsgálatokra van szükség annak eldöntése érdekében, hogy az azonosított RAP2.12 faktor ténylegesen kapcsolódik-e az ADH1 promoter ERE eleméhez.

```

1  MCGGAIISDF IPPPRSRRVT SEFIWPDLLK NLKGSKKSSK NRSNFFDFDA EFEADFQGFK
61  DDSSIDCDDD FVDGDFVADV KPFVFTSTPK PAVSAAAECS VFGKKVTGLD GDAEKSANRK
121 RKNQYRGIRQ RPWGKWA AEI RDPREGARIW LGTFKTAEEA ARAYDAAAARR IRGSKAKVNF
181 PEENMKANSQ KRSVKANLQK PVAKPNPNPS PALVQNSNIS FENMCFMEEK HQVSNNNNNQ
241 FGMTNSVDAG CNGYQYFSSD QGSNSFDCSE FGWSDQAPIT PDISSAVINN NNSALFFEEA
301 NPAKCLKSMD FETPYNTEW DASLDLFLNED AVTTQDNGAN PMDLWSIDEI HSMIGGVF

```

Unstructured: 1-42

Low complexity region: 45-56

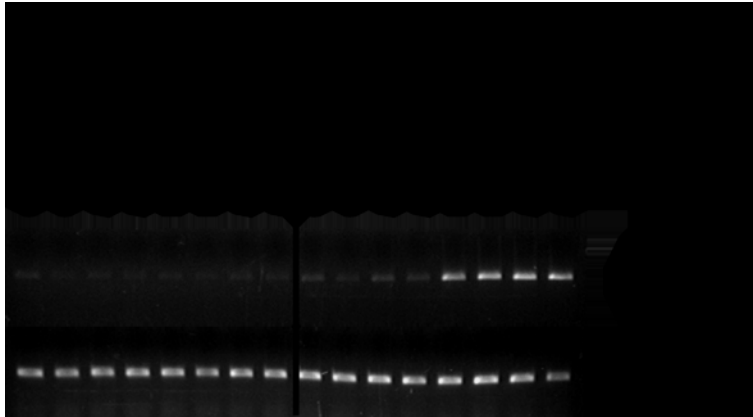
Low complexity region: 59-80

AP domain: 142-187

Unstructured: 201-213

14.. **Ábra.** Az ADH-LUC/121 vonalban azonosított AP típusú transzkripciós faktor (RAP2.12) aminosav szekvenciájának analízise.

Az azonosított RAP2.12 faktor transzkript szintje meglehetősen alacsony a vad típusú növényekben. Az ADH-121 vonalban a transzkript szint ösztadiol kezelés nélkül a vad típusú növényekhez hasonló, míg ösztadiol kezelés után néhány órán belül megemelkedik (15. **ábra**). Érdekes, hogy az ABA kezelés önmagában vagy ösztadiollal kombinálva nem befolyásolta a RAP2.12 faktor átírását. Genevestigator adatbázis szerint a RAP2.12 gén transzkripciója meglehetősen állandó, azt semmilyen hormon kezelés szignifikánsan nem változtatja meg. Kismértékű, maximum kétszeres aktiválás található levél szeneszcencia, hideg és ozmotikus stressz kezelés esetén.



15. Ábra. A RAP2.12 transzkripciós faktor expressziója a szülői, vad típusú ADH-LUC vonalban, illetve az ADH-121 vonalban. Az RT-PCR analízis eredménye mutatja, hogy a RAP2.12 expresszió alacsony szintű az ADH-LUC növényekben, illetve a 121 vonalban, amit nem befolyásol az ABA kezelés. A 121 vonalban a RAP2.12 expresszió ösztadiol hatására megemelkedik. Referencia gén: ubiquitin 10.

A két bemutatott példa egyértelműen bizonyítja, hogy az általunk kidolgozott új genetikai rendszer alkalmas a stressz jelátvitelben szerepet játszó szabályozó faktorok azonosítására. A részletesen vizsgált C38-33 illetve az ADH-121 vonal analízise megmutatta, hogy az ösztadiol függő transzkripciós aktiválás hatékony, és minimális háttérrel jár, vagyis kiválóan alkalmazható a stresszválaszban szerepet játszó gének funkcionális analízisének. A szabályozott expresszió arra is lehetőséget ad, hogy a cél gének aktiválását időben vizsgáljuk. A biolumineszcencia detektálás segítségével az ADH-LUC konstrukció kvantitatív és kinetikai analízise is megvalósítható, ami a génszabályozás pontosabb megértését teszi lehetővé.

## **Az eredményeket bemutató publikációk.**

### *Közlemények:*

L. Szabados, L. Zsigmond, Cs. Koncz (2004) Characterization of *sas1*: a novel salt, ABA and sugar hypersensitive *Arabidopsis* mutant. International Conference on Arabidopsis Research 2004, Berlin.

Székely, Gy., Ábrahám, E., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Strizhov, N., Koncz, Cs., Szabados, L. (2007) [Duplicated P5CS Genes Play Distinct Roles in Stress-dependent and Developmental Regulation of Proline Biosynthesis in Arabidopsis](#) (submitted to Plant Cell).

Papdi C, Popescu C, Ábrahám E, Koncz C, Szabados L (2006) Identification of stress regulatory genes in Arabidopsis by random cDNA library transformation. (in preparation)

### *Szabadalom:*

Szabados László, Zsigmond Laura, Koncz Csaba: Növények stressztoleranciájának javítása. No.: P0500811, Bejelentés: 2005.08.31