



Szent István Egyetem
Gödöllő

Az UV-B jelátvitel molekuláris genetikai vizsgálata *Arabidopsis thaliana*ban: a COP1 E3 típusú ubiquitin ligáz és a HY5 bZIP transzkripciós faktor pozitív szabályozó szerepe

Doktori értekezés tézisei

Oravecz Attila

Gödöllő - Freiburg
2007

A doktori iskola

Megnevezése: Biológiatudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető, a biológia tudományok doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezető: Dr. Orosz László
tanszékvezető, az MTA levelező tagja
ELTE, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet,
Genetikai Tanszék

Dr. Roman Ulm
csoportvezető, Ph.D.
Albert-Ludwigs-Egyetem Freiburg, Biológiai Kar,
II. sz. Biológiai Intézet, Növénytani Tanszék

.....
Dr. Tuba Zoltán

.....
Dr. Orosz László

ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az élőlények túlélésének alapvető feltétele, hogy pontosan érzékeljék és válaszoljanak környezetük változásaira. A környezeti tényezők között a fénynek kiemelkedő fontossága van a napenergiát közvetlenül megkötni, és azt más élőlények számára felhasználható kémiai energiává átalakítani képes növények számára. Fénykörnyezetük folyamatos ellenőrzésére a növények kifinomult fényérzékelő rendszereket fejlesztettek ki. Három ismert növényi fotoreceptor család "figyeli" a földfelszínre jutó napfény szinte teljes spektrumát: a fitokrómok (PHY) a vörös/távoli-vörös, a kriptokrómok (CRY) és fototropinok (PHOT) pedig a kék/UV-A tartományában érzékenyek. A fény detektálása ezen fotoreceptorokon keresztül összetett jelátviteli útvonalakat aktivál mely végül nagyszámú génnek és szinte minden fontosabb biokémiai útvonalnak a szabályozását eredményezi.

Az egyik legjobban tanulmányozott fény által szabályozott folyamat a fotomorfogenezis, vagy de-etioláció. Ennek során a növények a sötétben növekvő, endospermiumfüggő embrióból fényben növe, önnfentartó fotoautotróffá fejlődnek. Ez az alapvető növekedés- és fejlődésbeli változás nagymértékben a fotoreceptorok és az általuk szabályozott jelátviteli útvonalak szabályozása alatt áll. Ezen jelátviteli folyamatok két szereplőjének kulcsfontosságú szerepe jól ismert. A HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) bZIP típusú transzkripciós faktor egy elengedhetetlen pozitív szabályozó komponense a fény indukálta génextpresszióknak és fotomorfogenezisnek. A *hy5* mutánsok fény jelenlétében is részlegesen etiolált fenotípussal rendelkeznek ami arra utal, hogy a HY5 több fotoreceptor család jelátvitelében is részt vesz.

A fény szignáltranszdukciós útvonalainak másik alapvető fontosságú szabályozója a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) E3 típusú ubiquitin ligáz. A COP1 a fotomorfogenezis központi represszoraként működik. Sötétben ubiquitinnel jelöli meg a HY5-öt, és a fény válaszok más pozitív szabályozó faktorait, mely azok proteasómális degradációjához vezet.

Fényérzékelés hatására a COP1 sejtmagi export útján inaktíválódik, a represszált pozitív szabályozók gátlása feloldódik és a fény függő transzkripció beindul. Bár a *cop1* null mutációk letálisak, a hipomorf *cop1* allélokat hordozó növények a fény teljes hiányában is fotomorfogenikus fejlődésen mennek keresztül. Ezzel szemben a *cop1^{eid6}* mutáns sötétben normális etiolált növekedést mutat, míg, hasonlóan a többi életképes *cop1* mutánshoz, rendkívüli fény-túlérzékenységgel rendelkezik. A COP1 funkciójának több szabályozója is ismert a látható fény/UV-A jeátvitelben, melyek mindegyike egyrészt szabályozza a COP1 működését másrészt pedig elengedhetetlenül szükséges is ahhoz. Ezek a négy tagot számláló SPA (SUPPRESSOR OF PHYA) fehérje család, és két multifehérje komplex: a CSN (COP9 SIGNALOSOME) és a CUL4-RBX1-CDD (CULLIN4-RING-BOX 1-COP10-DDB1-DET1) komplex.

Az ultraviola (UV) sugárzás a földfelszínre jutó napfény rendkívül lényeges részét képezi. Mivel a sztratoszférikus ózon réteg a 290 nm-nél rövidebb hullámhosszúságú sugárzást teljes mértékben elnyeli, csak az UV-B (280-320 nm) tartomány hosszabb hullámhosszúságú része és a teljes UV-A (320-400 nm) tartomány éri el a földfelszínt és így rendelkezik biológiai jelentőséggel. A növények, mint fotoautotróf és helyhez kötött szervezetek szükségszerűen kitettek a fényspektrum ezen tartományának is. Az UV sugárzásnak az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásai, melyek gyakorlatilag minden fontosabb biomolekula és sejtalkotó sérüléséhez vezethetnek, jól ismertek. Az alacsony szintű (hosszabb hullámhosszúságú, kis dózisu) UV-B sugárzás azonban nemcsak környezeti stressz tényező, hanem a fejlődést specifikusan szabályozó információs szignál is mely specifikus szabályozási mechanizmusokat is indukál, hasonlóan az ismert fotoreceptorok által detektált látható és UV-A fényhez.

Az egyik ilyen, a károsodásoktól független, szabályozott UV-B válaszreakció a fenilpropanoid bioszintézis aktiválásának köszönhetően megemelkedett flavonoidtermelés. A flavonoidok az igen hatékony UV-B elnyelésük miatt ún. "UV-szűrő" pigmentekként működnek. A flavonoid bioszintézis egyik fő

Nemzetközi konferencián bemutatott poszter

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Nagy, F., Ulm, R. (2005). A novel regulatory mechanism in the UV-B response of *Arabidopsis*. 2nd Tri-National Arabidopsis Meeting, Advancing the Genomics Frontier. Neuchâtel, Switzerland

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Oakeley, E.J., Schafer, E., Nagy, F., and Ulm, R. (2004). The UV-B response of *Arabidopsis* involves the bZIP transcription factor HY5. 2nd EPSO Conference – In honour of Jeff Schell "Interactions in Plant Biology: cells, plants and communities". Ischia, Italy

Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Máté, Z., Oakeley, E., Schäfer, E., Nagy, F. (2004) The UV-B response in *Arabidopsis* involves the bZIP transcription factor HY5. 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, Germany

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Funk, M., Oakeley, E.J., Schafer, E., Nagy, F., and Ulm, R. (2003). Gene expression profiling indicates distinct perception and signaling mechanisms in response to UV-B. International Plant Biology Meeting. Marburg, Germany

Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Funk, M., Schäfer, E., Oakeley, E. and Nagy, F. 2003. Global gene expression changes indicate distinct perception and signaling mechanisms in response to UV-B irradiation. Juan March Workshop on Plasticity in Plant Morphogenesis. Madrid, Spain

két fehérje direkt interakciója UV-B jelenlétében. További biokémiai, sejtbiológiai és genetikai vizsgálatok a teljes genom szintű transzkripciós vizsgálattal együtt nagymértékben segíteni fogják ezekben a kérdéseknek a megválaszolását.

Összefoglalva: az itt bemutatott munka az *Arabidopsis thaliana*-nak az alacsony szintű UV-B sugárzásra adott transzkripciós és fiziológiai válaszképzésére nyújt betekintést. A HY5 transzkripciós faktor és a COP1 ubiquitin ligáz létfontosságú pozitív szabályozó feladatokat töltenek be ezekben a folyamatokban, melyek során a COP1-nek egy új, eddig még nem ismert funkciója fejeződik ki. A COP1-HY5 szignál transzdukciós útvonalon keresztül működő UV-B jelátvitel elegendhetlen a károsító UV-B sugárzás elleni védelem kialakításához, az UV tolerancia kifejlődéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Szakcikkek lektorált folyóiratokban

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Brzezinska, A., Molinier, J., Oakeley, E.J., Ádám, É., Schafer, E., Nagy, F., and Ulm, R. (2006). CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1975-1990. (IF: 11,088)

Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Máté, Z., Ádám, É., Oakeley, E.J., Schafer, E., and Nagy, F. (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1397-1402. (IF: 10,452)

Előadás nemzetközi konferencián

Oravecz, A., Baumann, A., Máté, Z., Nagy, F., Ulm, R. (2005). A novel regulatory mechanism in the UV-B response of *Arabidopsis* requires the bZIP transcription factor HY5 and the E3 ubiquitin ligase COP1. 2nd Tri-National Arabidopsis Meeting, Advancing the Genomics Frontier. Neuchâtel, Switzerland

sebességmeghatározó enzime a CHS (CHALCONE SYNTHASE), mely egy jól megalapozott modellt ként szolgál az UV-B és más fénytartományok kölcsönhatásainak vizsgálatára. A *CHS* génexpresszió szabályozását az UV-B, PHY és CRY jelátviteli hálózatok kölcsönhatásai együttesen befolyásolják.

A növények UV-B sugárzásra adott morfogénikus válaszképzésének vizsgálata a növényi molekuláris biológiai kutatásoknak egy új területe. Ezen környezeti tényező érzékelésében és jelátvitelében szerepet játszó komponensek ezidáig alig ismertek, amit legjobban a molekulárisan azonosított UV-B fotoreceptor hiánya példáz.

E tanulmány célja volt, hogy mélyebb betekintést nyújtson az UV-B sugárzás érzékelésének és jelátvitelének hátterében lévő molekuláris mechanizmusokba, és hogy rávilágítson ezeknek a látható és UV-A fény szabályozta folyamatokhoz való viszonyára. Elsőként az alacsony szintű UV-B által kiváltott transzkripciós változások vizsgálata került kitűzésre, mely további alapot biztosított lehetséges új komponensek azonosítására és jellemzésére. Ezek alapján további cékitűzésként a COP1 és a HY5 UV-B jelátvitelben betöltött szerepének és viszonyának a felderítése szerepelt.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi anyag és mikroorganizmusok

Ezen munka során három vad *Arabidopsis thaliana* ökotípust (Columbia [Col], Landsberg *erecta* [Ler] és Wassilewskija [Ws]), illetve ezek különböző, nyilvánosan hozzáférhető mutáns válozatait használtuk. Az *Echerichia coli* TOP10, DH5 α és DB3.1 törzseket különféle klónozási célokra, míg az S17-1 törzset az *Agrobacterium* konjugációjára használtuk. Növények transzformálására az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) törzset használtuk.

Molekuláris biológiai és mikrobiális módszerek

A nukleinsavak izolálása és manipulálása (plazmid DNS tisztítás, növényi kromoszóma DNS izolálás, RNS kivonás, restrikciós endonukleáz emésztés, elektroforetikus elválasztás, DNS fragmentum izolálás, polimeráz lánreakció, szekvenálás), fehérjék izolálása, az *E. coli* transzformálása és az *A. tumefaciens* konjugációja a molekuláris biológiában és a mikrobiológiában széles körben alkalmazott eljárásoknak, az irodalomban szereplő technikáknak és a különböző gyártók javaslatainak megfelelően kerültek kivitelezésre.

RNS gél blot analízis

10 µg teljes RNS kivonatot 1%-os formaldehid-agaróz gélen elválasztottunk, majd mostunk és kapilláris transzfer segítségével Hybond N+ nylon membránra blottoltunk 10xSSC pufferben. Az UV-keresztkött membránokat előhibridizálást követően éjszakán át hibridizáltuk 5xDenhardt reagenst tartalmazó hibridizációs pufferben radioaktívan jelölt génspecifikus DNS próbával. A membránokat mosást követően autoradiográfiával detektáltuk. A többszöri hibridizáláshoz a membránokról az előző próbákat eltávolítottuk, és a membránokat újra hibridizáltuk.

Immunoblot analízis (Western blot)

A 20-30 µg teljes sejtféhrje kivonatot SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd éjszakán át elektroforetikus folyadéktranszferrel polivinilidén difluorid (PVDF) membránra blottoltuk. A fehérje blottokat fajlagos anti-HY5 (Eurogentec), anti-CHS és anti-Aktin (Santa Cruz) poliklonális valamint anti-GFP (Babco) monoklonális elsődleges antitestekkel, majd torma peroxidázzal kapcsolt nyúl (anti-HY5 ellen), kecske (anti-CHS és anti-Aktin ellen) és egér (anti-GFP ellen) másodlagos immunoglobulinokkal inkubáltuk. Az "ECL+ Western blotting and detection system"-et (Amersham) használtuk a blottok kemilumineszcens detektálására. Az antitest inkubációkat és mosási lépéseket is ezen kit javaslatai alapján végeztük.

fény jelátviteli folyamatai közös szereplőket használnak de eltérő mechanizmusokon keresztül.

Több eredmény is arra utal, így például a *hy5* mutánsokban fennmaradó génaktiváció, hogy a HY5-ön kívül más faktorok is szabályozzák a HY5 függő gének UV-B indukált transzkripcióját. Ezzel összhangban a vizsgálataink azt mutatják, hogy a HYH (a HY5 leközelebbi homológja) kis mértékben hozzájárul ezen gének regulációjához.

Az UV-B jelátvitelben részt vevő további szereplők szükségességére utalnak azon vizsgálataink, melyek kimutatták, hogy a HY5 túltermelése önmagában nem elégséges megnövekedett UV-B válasz kiváltásához, vagyis a HY5 bár szükséges, de nem elégséges az UV-B indukált transzkripció szabályozásához. Ez különösen érdekes abból a szempontból, hogy a HY5-ből hiányzik a bZIP transzkripció faktorokra jellemző prolinban és savas karakterű aminosavakban gazdag transzaktivációs domén. Mindez arra utal, hogy más szabályozó komponenseknek a HY5-vel való együttműködése szükséges a HY5 által szabályozott gének UV-B általi aktiválásához. Ezen komponensek jövőbeni azonosítását nagymértékben segíteni fogják a laboratóriumunkban elvégzett genom szintű UV-B expressziós analízisek eredményei.

Eddigi eredményeink alapján feltétezzük, hogy az UV-B jelátvitel egyik fontos eleme a COP1 funkciójának szabályozása. Ennek célja: a) egyrészt a *HY5* transzkripciójának indukciója egy ezidág még ismeretlen mechanizmus által, mely történhet a *HY5* expresszióját szabályozó esetleges represszor UV-B indukált degradációján keresztül, vagy lehetséges pozitív szabályozók direkt aktivációján keresztül pl. monoubiquitilálással; b) másrészt a *HY5* fehérje accumulációjának biztosítása a COP1-nek a *HY5* ellen irányuló degradatív funkciójának a gátlásával. A COP1 funkció UV-B hatására történő megváltoztatásának módja lehet a COP1 biokémiai aktivitásának módosítása vagy target affinitás megváltoztatása például poszt-transzlációs módosítások által vagy akár alternatív, UV-B specifikus COP1 komplexek összeállításán keresztül. Nyitott kérdés még a COP1-HY5 viszonyában a

pozitív szabályozóként működik az UV-B szignál transzdukció során. Az utóbbi eset éles ellentétben áll a COP1 eddig ismert funkciójával, mely a HY5 proteaszómális degradációját biztosítja. Ezzel szemben UV-B-ben a COP1 a HY5 transzkripciójának aktivációjához szükséges. Eredményeink alátámasztják továbbá, hogy a COP1-től függő transzkripció aktivációja mellett a HY5 fehérje szinten is stabilizálódik UV-B jelenlétében. Ennek alapján feltételezzük, hogy az UV-B sugárzás a COP1-nek a HY5 ellen irányuló degradatív funkcióját gátolja.

Vizsgálataink igazolták, hogy a COP1 az UV-B által indukált gének egy szélesebb körének, míg a HY5 azok szűkebb körének aktivációjához szükséges. Ezen eredmények a COP1 és a HY5 UV-B jelátvitelben betöltött egymást követő szabályozó szerepére utalnak. *cop1-4* és *hy5-1* mutánsokon végzett RNS gél blot és Western blot vizsgálatok valamint flavonoid termelés mérések kimutatták, hogy a *CHS* gén aktivációjához és megemelkedett fehérje termeléséhez, valamint az ebből adódó megnövekedett flavonoid akkumulációhoz a *HY5* gén indukciója és fehérje termelése szükséges, ami viszont funkcionális COP1 fehérjét igényel. Ez a COP1-HY5 útvonal tehát szükséges az UV-B sugárzás károsító hatásaival szembeni védelem kialakításához és így a növények túléléséhez.

Érdekes, hogy ellentétben a többi vizsgált életképes *cop1* mutánsal, a *cop1^{eid6}*, bár látható fényben hiperszenzitív cop fenotípusa van, az UV-B válaszok tekintetében vad fenotípust mutat. Mindez arra utal, hogy a COP1 különböző szerkezeti elemeinek eltérő szerepe lehet az UV-B és a látható fény közvetítette jelátvitel szabályozásában.

A COP1-nek a látható fény jelátvitelében betöltött funkciójához elengedhetetlen fehérjék és fehérje komplexek mutánsainak (*spa1234*, *csn5a* és *det1-1*) transzkripció vizsgálatából származó eredmények arra engednek következtetni, hogy ezek a komponensek (a SPA fehérjék, a CSN és a CUL4-RBX1-CDD E3 ubiquitin ligáz komplex) a COP1 UV-B-ben betöltött szerepének szabályozásában nem vesznek részt. Ez alátámasztja, hogy az UV-B és a látható

Flavonoidkivonás és mérés

30-50 darab négynapos csíranövény tömegét megmértük, majd 500 µl flavonoid extrakciós pufferrel a flavonoid tartalmukat kivontuk amit papírtírkomatográfias eljárással 15%-os (v/v) ecetsav jelenlétében elválasztottunk. Az UV-A fény alatt bíborszínű flavonoidokat izoláltuk, visszaoldottuk és abszorbanciájukat (360 nm) spektrofotométerrel meghatároztuk.

Növények nevelése és UV-B kezelések

A felszín-sterilizált *Arabidopsis* magok csírázását indukáltuk, majd steril körülmények között csíráztattuk és neveltük MS agar lemezekon 25°C-on standard fénykamrában vagy a keskenysávú UV kamrában. A kísérletekhez 4 illetve 7 napos csíranövényeket használtunk. Az UV-B kezeléseket két különböző UV-forrással végeztük: egy szélessávú UV-forrás szolgált a 15 perces, míg egy keskenysávú UV-forrás a folyamatos kiegészítő (fehér fény + UV-B) kezelések kivitelezésére. A különböző UV-B tartományokat 3 mm-es üvegszűrők használatával állítottuk elő.

Transzgenikus növények előállítása

A "virágzat merítés" módszerét használtuk az *Arabidopsis* növények transzformálására. A megfelelő bináris vektorokat hordozó és így a transzformált növények szelekciójához higromicin rezisztenciát biztosító bináris vektorokat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzset alkalmaztuk. Az elsődleges transzformánsokat a rezisztencia alapján szelektáltuk, majd genetikailag igazoltuk, hogy egy lokuszon integrálva hordozzák a transzgént.

Epifluoreszcens és fény mikroszkópia

Az 1-3 db csíranövényt üveg tárgylemezen, vízben vizsgáltuk Axioscope II (Zeiss) epifluoreszcens és "differencial interference contrast" (DIC) mikroszkóppal, mely HBO 100 higany ívfény lámpával, standard YFP és Rodamin filterkészlettel valamint 63x Plan-Apochromat olaj immerziós objektívvel

(N.A.=1.4) volt felszerelve. A felvételek készítéséhez AxioCam digitális kamerát (CCD pixel méret=6.7 µm; Zeiss), Axiovision programot (v2.0.6.1; Zeiss) és ImageJ 1.37v programot (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) használtunk.

EREDMÉNYEK

Az alacsony szintű UV-B indukálta transzkripciós változások vizsgálata

Három különböző ökotípushoz tartozó vad típusú *Arabidopsis* csíranövényeket kezeltünk alacsony szintű UV-B sugárzással, és az ezekből származó teljes RNS kivonatokat RNS gél blott analízissel vizsgáltuk. Az eredmények egyértelműen kimutatták, hogy mindhárom ökotípusban a kezelés egy géncsoport gyors és átmeneti indukcióját eredményezte. Ezen gének egy jelentős része transzkripciós faktorokat kódol. Érdekes módon az indukált gének egy alcsoportja gyengébb indukcióval válaszol az erősebb (rovidebb hullámhosszú) UV-B sugárzásra, míg ugyanerre a stimulusra egy másik alcsoport indukciója változatlan marad, vagy még erősebb választ mutat.

Az ismert fotoreceptorok és a DNS károsodást közvetítő folyamatok szerepe az UV-B indukálta transzkripció szabályozásában

Az ismert fotoreceptorok és a DNS károsodást közvetítő folyamatok lehetséges szerepének vizsgálata érdekében fotoreceptor mutánsokat (*phyAphyB*, *cry1cry2* és *phot1phot2*) és DNS a javító mechanizmusukban érintett mutánsokat (*uvr1uvr2* és *uvr1uvr3*) tettünk ki alacsony szintű UV-B kezelésnek, majd vizsgáltunk RNS gél blott analízissel. A vizsgált UV-B indukált gének transzkriptuma mindegyik mutáns esetében a megfelelő vad típushoz hasonló mértékben akkumulálódott a kezelés hatására. A *cry1cry2* mutáns esetében azonban a vizsgált gének egy csoportjának expressziója a hosszabb hullámhosszú UV-B tartomány irányába enyhén eltolódott mintázatot mutatott.

endogén HY5 fehérje UV-B által kiváltott termelődését a működőképessé YFP-COP1-et túltermelő vonalakban igazoltuk.

9. Kimutattuk, hogy a *spa1234*, *csn5a* és *det1-1* mutánsok az UV-B kezelésre a vad típushoz hasonló transzkripciós válaszreakcióval reagálnak.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Ez a munka az alacsony szintű UV-B sugárzás által kiváltott transzkripciós változásokat jellemzi, és bemutatja a HY5 transzkripciós faktor és a COP1 E3 ubiquitin ligáz szerepét és kapcsolatát az UV-B jelátvitelben.

Az UV-B sugárzás által indukált gyors és átmeneti transzkripciós változások, illetve a transzkripciós faktorok számottevő jelenléte az UV-B indukált gének között arra utal, hogy hasonlóan a látható fény jelátviteli folyamataihoz, az UV-B hatására is összetett szabályozási hálózatok aktiválódnak. Az UV-B által indukált gének két alcsoportjának az UV-B hullámhosszától függő eltérő szabályozása arra enged következtetni, hogy legalább két különböző, egymással kölcsönható UV-B érzékelő és jelátviteli rendszer működik az *Arabidopsis thaliana*-ban. Ezen transzkripciós válaszoknak az ismert fotoreceptoroktól való függetlensége alátámasztja azt az elképzelést, miszerint egy (vagy több) fajlagos UV-B fotoreceptor felelős ezek szabályozásáért. Az expressziós mintázatoknak a vad típustól való eltérése a *cry1cry2* kettős mutánsban a kriptokróm és az UV-B jelátviteli kaszkádok lehetséges kölcsönhatására utal. A DNS javító mechanizmusok mutánasainak a vad típushoz hasonló transzkripciós válaszreakciója továbbá azt mutatja, hogy az általunk vizsgált folyamatok függetlenek az általános DNS károsodást közvetítő jelátviteltől.

Biokémiai, sejtbiológiai és fiziológiai vizsgálataink igazolták, hogy a látható fény/UV-A jelátvitel két kulcsfontosságú szabályozója, a HY5 és a COP1, elengedhetelen szereplői az UV-B jelátvitelnek is. Mind a HY5 mind a COP1

is részt vesznek-e. A *spa1234* négyszeres, és a *csn5a* és *det1-1* egyszeres mutánsok RNS gél blot analízise kimutatta, hogy ezekben a mutánsokban a vizsgált gének UV-B indukciója a vad típushoz hasonlóan ment végbe.

Új tudományos eredmények

1. Leírtuk és jellemeztük az alacsony szintű UV-B sugárzás által kiváltott transzkripciós változásokat. Igazoltuk, hogy ezek függetlenek az ismert fotoreceptoroktól és a DNS károsodást közvetítő jelátviteltől. Kimutattuk, hogy ezen UV-B indukálta gének két alcsoportja az UV-B hullámhosszától (erősségétől) függően eltérően szabályozódik.
2. A HY5 transzkripciós faktor génexpressziójának UV-B hatására történő gyors és átmeneti aktivációját és megemelkedett fehérje termelését bizonyítottuk.
3. Igazoltuk, hogy a *hy5* null mutánsokban az UV-B indukálta gének egy része nem vagy csak kis mértékben aktiválódik. Ezen gének egy csoportján (pl. *CHS*) bemutattuk, hogy UV-B indukciójuk a HY5 aktivációját időben követi. Kimutattuk a HY5 fehérje UV-B jelenlétében történő stabilizációját.
4. A *hy5* null mutánsok drasztikusan csökkent UV-B-függő flavonoid termelését és súlyosan gyengült UV-B toleranciáját igazoltuk.
5. Kimutattuk, hogy a működőképes HY5 fehérje túltermelése önmagában nem elegendő az UV-B válaszok magasabb szintű aktiválásához. A HYH UV-B-ben betöltött kisebb mértékű szabályozó funkcióját bemutattuk.
6. Igazoltuk, hogy bizonyos *cop1* mutánsokban az UV-B indukált gének széles körének, beleértve a HY5-öt is, transzkripciós aktivációja nem történik meg UV-B hatására. Ezekben a mutánsokban nem emelkedik meg a flavonoid termelés UV-B jelenlétében.
7. Kimutattuk, hogy a *cop1^{eid6}* mutáns a vad típushoz hasonló UV-B válaszreakciókat mutat.
8. Bizonyítottuk mind a HY5-YFP mind az YFP-COP1 fehérjéknek az UV-B hatására történő sejtmagi feldúsulását. A vad típushoz hasonló mértékű

A HY5 bZIP transzkripciós faktor UV-B indukciója

A génexpressziós vizsgálataink kimutatták, hogy a fotomorfogenezis kulcsfontosságú szabályozójának, a HY5 transzkripciós faktornak az expressziója alacsony szintű UV-B sugárzás hatására aktiválódik. Western blot vizsgálatokkal igazoltuk továbbá, hogy kiegészítő UV-B kezelést követően a HY5 fehérje megemelkedett termelése is már 2 órával a kezelés megkezdése után kimutatható. Igazoltuk azt is hogy UV-B sugárzás jelenlétében a fehérje mennyisége magas marad még akkor is, amikor a HY5 mRNS mennyisége az alap szintre áll vissza.

A HY5 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata érdekében stabil transzgénikus vonalakat hoztunk létre, melyek a *hy5-1* mutáns háttérben a HY5 promóterének irányítása alatt fejeznek ki egy HY5-YFP (YELLOW FLUORESCENT PROTEIN) fúziós fehérjét (*hy5-1/Pro_{HY5}:HY5-YFP*). Az YFP fluoreszcenciájának fluorescens mikroszóp segítségével történő detektálásán keresztül a HY5 fehérje sejten belüli elhelyezkedése meghatározható. A transzgén funkcióképességét komplementációs vizsgálatokkal igazoltuk. Ezen vonalak epifluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata a HY5-YFP fehérje 1-6 órán belüli intenzív sejtmagi akkumulációját mutatta ki a kiegészítő UV-B kezelés során.

A HY5 szerepe az UV-B válaszreakciók szabályozásában

Hogy a HY5 UV-B-ben betöltött szerepének jelentőségét megállapítsuk, *hy5-1* null mutánsok RNS gél blot vizsgálatát és flavonoid termelésének mérését végeztük el. Kimutattuk, hogy a *hy5-1* mutánsban az UV-B indukált gének egy része nem, vagy csak nagyon gyengén aktiválódik az UV-B kezelése hatására. Ezek közé tartoznak a flavonoid bioszintézis egyes résztvevői, mint például a *CHS*. A transzkripciós aktiváció elégtelenségével összhangban a *hy5-1* mutáns flavonoid termelése is jelentős mértékben elmaradt a vad típuséhoz képest, és ezek a növények súlyosan csökkent UV-B toleranciát mutattak.

A HY5 szerepének további vizsgálatára a HY5-öt túltermelő stabil transzgenikus vonalakat hoztunk létre, melyek a CaMV 35S promóter segítségével a *hy5-1* mutáns háttérben termelik túl a HY5 fehérjét (*hy5-1/Pro_{35S}:HY5-YFP*). A transzgen funkcióképességét komplementációs vizsgálatokkal igazoltuk. Ezen vonalak RNS gél blot analízisével a vizsgált UV-B indukált géneknek a vad típushoz hasonló mértékű transzkripció aktivációját mutattuk ki.

A HYH szerepe az UV-B válaszreakciók szabályozásában

RNS gél blot vizsgálatokkal kimutattuk, hogy némely HY5-függő gén esetében egy fennmaradó kis mértékű UV-B indukció megfigyelhető maradt a *hy5* mutánsban. Ezért megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy más faktorok is hozzájárulhatnak a HY5 által szabályozott UV-B indukálta gének regulációjához. Korábbi eredményeink kimutatták, hogy a *HY5* legközelebbi homológjának, a *HYH*-nak (HY5-HOMOLOG), a transzkripciója UV-B hatására indukálódik. *hyh* egyszeres és *hyhhy5* kettős mutánsok RNS gél blot vizsgálatával kimutattuk, hogy a *hy5* mutánsban fennmaradó kismértékű UV-B indukálhatóság a *hyhhy5* kettős mutánsban bizonyos gének esetében elveszett, míg mások esetében megmaradt. Továbbá kimutattuk, hogy az UV-B indukálta flavonoid termelés tekintetében sem a *hyh* nem tért el jelentősen a vad típusától, sem pedig a *hyhhy5* kettős mutáns a *hy5* mutánstól.

A COP1 E3 ligáz szerepe az UV-B válaszreakciók szabályozásában

A HY5-nek és a COP1 E3 ligáznak a látható fény jelátvitelének szabályozásában ismert szabályozási kapcsolata alapján megvizsgáltuk a COP1 lehetséges szerepét az UV-B válaszreakciókban. Stabil transzgenikus vonalakat állítottunk elő, melyek a *cop1-4* mutáns háttérben a CaMV 35S promóter szabályozása alatt túltermelik az YFP-COP1 fúziós fehérjét. A konstrukció működőképességét komplementációs vizsgálatokkal igazoltuk. Ezen vonalak epifluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatával kimutattuk, hogy az YFP-COP1

fehérje megemelkedett vagy csökkent sejtmagi akkumulációt mutatott a kiegészítő UV-B kezelés jelenététől illetve hiányától függően.

Hogy a COP1-nek az UV-B-ben betöltött szerepének jelentőségét megállapítsuk, *cop1* mutánsok RNS gél blot és Western blot vizsgálatát valamint flavonoid termelésének mérését végeztük el. Kimutattuk, hogy a *cop1-4* és *cop1-1* mutánsok esetében az UV-B indukálta gének széles körének, beleértve a HY5 függő géneket és magát a *HY5*-öt is, transzkripció aktivációja nem történt meg az UV-B stimulus hatására. Ezekkel összhangban igazoltuk továbbá, hogy a *CHS* gén indukciója és fehérje akkumulációja, illetve az UV-B indukált megemelkedett flavonoid termelés sem működött ezekben a mutánsokban, melyek csökkent UV-B toleranciát is mutattak.

Ugyanezek a vizsgálatok a *cop1^{eid6}* mutánsban kimutatták, hogy ez a *cop1* mutáns a vad típushoz hasonló UV-B válaszreakciókkal rendelkezik.

A HY5 fehérje stabilitásának és a COP1 funkciójának viszonya az UV-B jelátvitelben

Sejtbioológiai vizsgálataink kimutatták, hogy mind a COP1 mind a HY5 nagy mennyiségben halmozódott fel az UV-B kezelt növények sejtmagjaiban. Ez ellentmondásban áll a COP1 eddig ismert, a HY5 szabályozását biztosító represszor funkciójával. Ezért Western blot analízissel megvizsgáltuk az endogén HY5 fehérje szintjét olyan UV-B kezelt növényekben, melyek funkcionális YFP-COP1 fehérjét termeltek túl. Igazoltuk, ezekben a növényekben a HY5 fehérje a vad típushoz hasonló mennyiségben termelődött.

A COP1 ismert szabályozóinak szerepe az UV-B által indukált transzkripcióban

A látható fény jelátviteli folyamatai során bizonyos fehérjék és fehérje komplexek a COP1 működéséhez és szabályozásához elengedhetetlenül fontosak. Megvizsgáltuk, hogy vajon ezek a komponensek az UV-B jelátvitel regulációjában