

## Válasz Dr. Szabados László opponensi véleményére és kérdéseire

Reflektálás a „Hideg által indukált, fagyűrést és vernalizációt szabályozó folyamatok molekuláris hátterének vizsgálata gabonafélékben” című doktori értekezés nyilvános vitájához készített bírálatra

Szeretném megköszönni Dr. Szabados Lászlónak, hogy elvállalta a dolgozat bírálatát, és időt, energiát szánt az értekezés alapos átnézésére, véleményezésére. Köszönöm szépen az építő jellegű kritikákat és az elgondolkodtató, inspiráló kérdéseket!

Válaszaim az Opponens által feltett kérdésekre:

Kérdés: Van -e funkcionális különbség a VRN1 faktortól függő aktivációt mutató, illetve attól függetlenül működő CBF gének között? Esetleg ismert -e a CBF promoter régiókban hasonlóság / különbség? Van-e arra adat, hogy a VRN1 faktor kötődik -e az általa szabályozott CBF gének promoteréhez? Transzkripciós represszornak tekinthető -e a VRN1? Milyen különbségek lehetnek a részletesebben ismert *Arabidopsis* és a gabonafélék CBF illetve VRN génjeinek működése, funkciója között?

Válaszom: A vizsgált gabonafélék közül árpában 17, alakorban 13 különböző CBF transzkripciós faktort írtak le, melyek valószínűleg lokális génduplikációk következtében alakultak ki. Árpa, rizs és búza közeli rokon CBF fehérjéinek klaszter analízise szerint három főbb CBF csoport különíthető el. Az említett CBF klaszterek egy csoportba tartozó tagjai között azonban vannak olyanok, melyek egyértelműen hidegérzékeny aktivációt mutatnak (például a *CBF12* és *-14*), s olyanok is, melyek esetében korábbi kutatások eredménye alapján ez nem volt kimutatható. A dolgozatban bemutatott kísérlet során is mozaikosan kaptunk kevésbé megszólaló, erőteljesen hidegindukálható, s azon belül is a *VRN1* gén működése által befolyásolt CBF géneket a különböző klaszterekből.

Bár az összehasonlító térképezési adatok alapján a gabonafélék genomjai között nagymértékű makrohómológia figyelhető meg, s az azonosított CBF klaszterek általánosan elkülöníthetők bennük, az egyes CBF gének egyedi szerepe még mindig nem bizonyított, mert a különböző fajokban, valamint egy fajon belül is a különböző genotípusokban eltérő mértékű az aktivációjuk, illetve más-más expressziós profilt mutatnak. Működésük bonyolult rendszerét tovább árnyalja, hogy bizonyos CBF gének alacsony szinten stresszmentes körülmények között is expresszálódnak (például a *CBF5*), valamint aktivitásuk a generatív átmenetet követően is megfigyelhető. Ez a géntermék lassú, egyenletes akkumulációjához, s valószínűleg egy fajra jellemző, alapszintű hidegtűrés kialakulásához vezet. Más CBF gének (például a *CBF14*) viszont csak stressz hatására, ám akkor gyorsan (pár óra alatt), fokozott mértékben szólnak meg, majd aktivitásuk lecseng, s ha a hideghatás továbbra is fennáll, akkor alacsonyabb szinten, diurnális ciklus szerint expresszálódnak. A *VRN1* gén működése valószínűleg ezen CBF gének szabályozására hatva befolyásolja a hidegakklimációs folyamatok következtében szerzett fagyállóságot. Egyes elképzelések szerint azonban nem is specifikusan az egyes CBF gének játsszák a kulcsszerepet, hanem termékeik össz mennyisége a meghatározó. Ezt alátámasztja, hogy tavaszi gabonafélékben a CBF gének általában kisebb kópiaszámban vannak jelen, valamint hogy az *Arabidopsis* három CBF génje is redundáns funkcionális aktivitással bír.

Bár a CBF gének alcsoportjainak működéséről viszonylag sok információnk van, a gének promotereinek megismerését célzó részletes kutatást gabonafélékben még nem végeztek. Fontos részeredmény viszont, hogy a CBF expressziót indukáló ICE transzkripciós faktor target elemének egy speciális variánsa található meg azoknak a CBF géneknek a

szabályozó régiójában, amik a hidegakklimációs folyamatok szabályozásával kapcsolatba hozhatók. A VRN1 faktorról szintén tudjuk, hogy van DNS-kötő domain-je, azonban nem valószínű, hogy a CBF gének promoteréhez közvetlenül kapcsolódva fejtené ki represszáló hatását. A VRN1 alapvetően a virágzást indukáló, a hajtáscsúcsi merisztémák fejlődési irányát befolyásoló faktor, ami a szöveti identitást meghatározó számos gén működését szabályozza. Bár ezt a hatást különböző gének aktivációja mellett MADS-box típusú florális represszorok gátlásával fejt ki, általános transzkripció represszornak nem tekinthető a VRN1. A hidegakklimációs rendszerre gyakorolt negatív hatása valószínűleg közvetett: az okozhatja, hogy a generatív átmenet, a szaporító szervek energiaigényes fejlődése a növényt az egyéb, szintén energiaigényes felépítő folyamatainak, például a védőanyagok termelésének gátlására készteti, ami közvetett módon, az epigenetikai mintázat megváltozásával, illetve RNS silencing mechanizmus révén is megvalósulhat.

A virágzásbiológiai kutatások legfontosabb alanya a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*, L.), azonban a kétszikű modellnövényen kapott eredményekből levont következtetéseket – bár vannak analóg elemei a két rendszernek - nem lehet közvetlenül alkalmazni egyszikű gabonafélékre.

#### A CBF gének működése:

- A CBF gének: *Arabidopsis*-ban három, génduplikáció során létrejött, egymáshoz nagyon közel elhelyezkedő, hidegindukálható CBF gén működik, melyek rövid ideig tartó hidegkezelést követően, egyszerre, nagyon hasonló mintázat szerint aktiválódnak, bár az általuk szabályozott gének csoportja némileg eltérő. Azonban bármelyik CBF géntermék túltermeltetése a CBF regulon hidegtűrést növelő aktivációjához vezet. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a hidegindukálható *Arabidopsis* CBF gének közel egyenrangúak, működésük átfedő, kiegészítő. Gabonafélékkel ellentétben expressziójukra az abszcizinsav, sóstressz és a dehidratáció nincs hatással. Feltételezhető, hogy szerepük kizárólag a hidegakklimációs folyamatok beindításában van. Gabonafélékben viszont a már bemutatott, összetettebb CBF rendszer működik, amely a hidegstresszre adott válaszreakciókat más rendszerek jelzéseivel is közvetlenül integrálja.

- A CBF-COR rendszer szabályozása: A CBF-COR rendszer és a VRN1 faktor öszi gabonafélékben megfigyelhető szoros kölcsönhatásához hasonló eredőjű, ám részleteiben különböző, konvergens evolúciós folyamatok során kialakult, analóg rendszer működik *Arabidopsis*-ban, ahol más szabályozó faktorok alakítják ki a CBF expresszió jellegzetes mintázatát: A SOC1 faktor alacsony szintje összefügg a hidegakklimációs folyamatoknak kedvez, míg főleg levélben történő akkumulációja a virágzás indukciójához közelítve gátolja az energiaigényes edződési folyamatok kifejeződését a CBF gének direkt gátlásával. Az ezt megelőző vegetatív periódus során viszont a hosszú nappalon stabilabb PIF4 és PIF7 proteinek gátolják a CBF gének aktivációját.

#### A VRN gének működése:

- A VRN gének: *Arabidopsis*-ban a VRN1 gén homológjának duplikációi, ami evolúciósan az egyszikűek és kétszikűek különválása után következett be, három paralóg gén kialakulását eredményezték: ezek az APETALA1 (AP1), a CAULIFLOWER (CAL) és a FRUITFULL (FRU) gének, melyek mind részlegesen megtartották képességüket a generatív átalakulás indukciójára. Nem virágzó *Arabidopsis* növény kialakításához tehát a három gén együttes deléciónja szükséges, ezzel szemben gabonafélékben a VRN1 gén kiesése önmagában is a

virágzás elmaradását eredményezi. (Érdekes különbség, hogy *Arabidopsis*-ban az AP1 gén viszont nem része a vernalizációs rendszernek.)

- A VRN gének kölcsönhatásai: A vernalizációs válaszgén egyéb faktorokkal való kölcsönhatása is lényeges különbségeket mutat *Arabidopsis*-ban és gabonafélékben. Gabonafélékben az *Arabidopsis* FT (FLOWERING LOCUS T) florigén faktorával homológ, hosszú nappalos megvilágítás által aktivált VRN3 serkentő hatással van a VRN1 gén működésére, segítve ezzel a vernalizációs rendszer aktiválását, s a CBF-COR rendszer inaktivációját. A VRN3 gén aktivitását nem vernalizált növényben a szintén hosszú nappalon aktív VRN2 lókuszt termékei (ZCCT1 és ZCCT2) gátolják, melyeknek *Arabidopsis*-ban viszont nincsenek egyértelműen azonosítható homológjaik. Gabonafélékben a virágzásindukció szabályozásában fontos szerepet betöltő nappalhossz változása tehát a PPD-CO (Photoperiod Response Genes - CONSTANS) rendszer mellett a VRN2 faktoron keresztül fejti ki hatását.

- A virágzást indukáló rendszer kulcspontjai és integrátorai: Lényeges különbség tehát, hogy habár fő merisztéma-identifikációs faktornak *Arabidopsis*-ban az AP1, gabonafélékben pedig az azzal homológ VRN1 faktor tekinthető, azonban míg gabonafélékben az elsődleges vernalizációs válaszgén szintén a VRN1, addig *Arabidopsis*-ban ezt a szerepet az FLC (FLOWERING LOCUS C) faktor tölti be (aminek viszont gabonafélékben nincs egyértelműen azonosítható homológja). Utóbbi ráadásul - a gabonafélék fő válaszgénjével ellentétben - a vernalizációs hideghatás következtében represszálódik, ezzel segíti a virágzásindukciót elindító folyamatokat. Lényeges különbség az is, hogy florális integrátornak, a vernalizációs hideghatást és a nappalhosszúságot érzékelő rendszer virágzásindukciót meghatározó, közös elemének *Arabidopsis*-ban az FT, gabonafélékben viszont a VRN2 faktor tekinthető.

- Tavaszi és őszi allélok: Fontos megemlíteni, hogy míg árpában és búzában elsősorban a VRN1 gén promoterében, illetve első intronjában, valamint a VRN2 gén „core” régiójában meglévő különbségek (deléciók, pontmutációk) felelősek a tavaszi és őszi jellegeket kialakító allelikus változatokért, addig *Arabidopsis*-ban az ilyen jellegű, jóval enyhébb különbségek inkább az FRI és FLC gének alléljainak kisebb működésbeli különbségeihez köthetők.

- Térbeli kifejeződés: A másik lényeges különbség *Arabidopsis* és gabonafélék merisztéma-identifikációs faktorainak működése között a térbeli kifejeződésük. Míg *Arabidopsis*-ban ezeknek a géneknek a termékei főleg a hajtáscsúcsban és a reproduktív szervekdeményekben vannak jelen, addig búzában, árpában, valamint zabban a VRN1 gén termékét levélben mutatták ki nagy mennyiségben.

Mivel a CBF faktorok által aktivált hidegakklimációs folyamatok energiaigényessége mindkét növénycsoportban negatívan befolyásolja a növekedést, ezért expressziójuk gátlása tavasszal adaptív folyamat, mivel a minél hatékonyabb terméskötés és magfeltöltés szempontjából előnyös a nagy biomasszahozam. Ez megmagyarázza, hogy miért fejlődhetett ki egymástól függetlenül, konvergens evolúció útján összetételét, lényeges tulajdonságait tekintve hasonló, ám részleteiben különböző rendszer *Arabidopsis*-ban és gabonafélékben.

Kérdés: Mivel az AG gén a virág fejlődését szabályozza, kizárható-e, hogy a megfigyelt virág nélküli fenotípus az AGLG1 deléció eredménye, illetve az AGLG1 hiánya befolyásolhatta-e a leírt fenotípust?

Válaszom: Az *AGLGI* gabonafélékben elsősorban a fejlődő kalászban fejeződik ki. Mivel a homozigóta recesszív mutáns növényekben nem csupán a kalásképzés, hanem már a hajtáscsúcsi merisztémák generatív átalakulása sem megy végbe, ebből arra következtethetünk, hogy a virágzásindukció korai, elsősorban a *VRN1* gén által befolyásolt lépései gátolódnak. Ezen felül kimutatták, hogy az *mvp* mutáció nem befolyásolja a többi, virágzásindukcióban szerepet játszó, kulcsfontosságú szabályozó gén működését, ami szintén bizonyítja a *VRN1* szabályozó faktor elsődleges szerepét a generatív szervek létrehozásának megindításában.

Kérdés: A dolgozat második felében bemutatott kísérleti rendszer miért árpa és miért nem a már vizsgált diploid búza, *T. monococcum* alkalmazásával került kidolgozásra?

Válaszom: A dedifferenciált szövettenyészeteken végzett kísérletek alanyának azért az adott őszi árpa genotípust választottunk, mert a megközelítés újszerűségéből adódóan számos módszerbeállítással kapcsolatos kihívással szembesültünk a kísérletek során, ezért a kiindulási kultúrák előállításához olyan növényi anyagot választottunk, ami jól kezelhető, szövettenyészeti rendszerben könnyen fenntartható, valamint gyorsabban előállítható belőle a kívánt mennyiségű és minőségű kallusz kultúra. Bár a dolgozatban ezt nem említettem, de a rendszert később kidolgoztam tavaszi árpa és a kenyérbúzával közelebbi rokon, ám technikailag nehezebben kezelhető őszi, valamint tavaszi *Triticum monococcum* genotípusokra is. Komplette eredménnyel azonban egyenlőre őszi árpára vonatkozóan tudunk szolgálni, ezért ezt a rendszert ismertettem a dolgozatomban.

Az őszi árpa tenyészetek használata mellett szólt az is, hogy az árpa az alakorhoz hasonlóan diploid genomfelépítésű, azonban ahhoz képest több információ áll rendelkezésünkre róla, jobb a transzformálhatósága, illetve kidolgozottabbak a fajon alkalmazható biotechnológiai módszerek. A szövettenyészeti rendszereken megkezdett kísérleteinket később farmakológiai megközelítés alkalmazásával, inhibitorokkal történő kezelések hatásvizsgálatával folytattuk. Ezt a munkát az Alkalmazott Genomika Osztály kutatóival közösen kivitelezett microarray kísérlet egészítette ki, amit szintén célszerűbb volt árpán elvégezni. A szövettenyészeteken kapott eredményeket elsősorban ezeknek a kísérleteknek az eredményeivel szeretnénk majd összevetni.

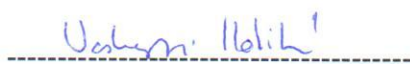
Kérdés: Mi lehet a Dicamba szerepe a hidegtűrés, illetve a stressz-hormonok szintjének változásában? Magyarázhatja-e az ellenállóképesség növekedését az említett hormonok (vagy származékaik) koncentrációjának, metabolizmusának változása?

Válaszom: A Dicambát abból a célból hozták létre, hogy vizes közegben stabil, a növények számára könnyen felvehető, szintetikus auxinanalóggént funkcionáló herbicidet biztosítsanak a mezőgazdaság számára. Mivel ezt az anyagot főleg gyomirtóként, valamint szövettenyésztés során, elsősorban transzformáns növények előállításakor használják, ezért hatását inkább gyakorlati megközelítésből, növények növekedési és túlélési paramétereinek, valamint szövettenyészetek kallogenezisének és növényregenerációs képességének a szempontjából vizsgálták. Növényekben elsősorban az aktívan fejlődő, fiatalabb részekben halmozódik fel, s auxinanalóggént a sejtosztódás és sejtmegnyúlás serkentésével a növekedési ráta emelkedését okozza. Kallusz tenyészetek anyagcseréjére gyakorolt hatását azonban eddig senki sem vizsgálta, ebben a témában sajnos egyébként is kevés irodalmi adat áll a rendelkezésünkre, mert a kallusz kultúrákat általában eszközként, köztes anyagként használják, s elsősorban a növényregenerációs képességük szempontjából vizsgálják őket.

A Dicamba általános anyagcsereserkentő és génexpressziós aktivitást növelő, valamint a stresszhormonok szintjére gyakorolt hatása valószínűleg szintén az auxinválasz kiváltásával magyarázható. Az egyik megközelítés a jelenség magyarázatára az lehet, hogy az exogén auxinanalóg viszonylag nagy koncentrációban történő alkalmazása kontroll körülmények között is enyhe stresszhatással van a kallusz tenyészetekre, ezért serkenti például az abszcizinsav és jazmonsav képződését. A jazmonsav az akklimációs folyamatokban a másodlagos anyagcsereutakat aktiváló hatása miatt, valamint jelátvivő molekulaként játszik szerepet, az általa befolyásolt szignáltranszdukciós utak valószínűleg a komplex védekezési mechanizmusok finomhangolását végzik. Hidegakklimációs folyamatokkal kapcsolatban felfedezték, hogy a jazmonsav specifikus, génexpressziót módosító hatását AP2/ERF (APETALA2 / Ethylene Responsive Factor) domaint tartalmazó transzkripciós faktorok közvetítik, amiknek egyik alcsoportjába sorolhatók maguk a CBF faktorok is. Ez alapján a jazmonsav endogén szintjében bekövetkező emelkedés a tartós hideghatás másodlagos hírvivőjeként, a CBF-COR rendszer aktivációjára „rásegítő” faktorként funkcionálhat. A jazmonsav-válasz és az abszcizinsav anyagcsere kölcsönhatása szintén kimutatható.

Az auxinanalógok a sejtosztódást és sejtmegnyúlást elősegítő anyagcserestimuláló hatás részeként a stresszhormonok képződését is növelik, közülük is elsősorban az abszcizinsav, illetve az etilén anyagcserejét serkentik, amit génexpressziós szinten *Arabidopsis* microarray kísérletek eredményei is megerősítenek. Az abszcizinsavtól függő jelátviteli utak és a hidegakklimációs folyamatok közötti kapcsolat ismeretében a Dicamba fagyállóságra gyakorolt pozitív hatása tehát a génexpressziós aktivitás növelése mellett valószínűleg az abszcizinsav anyagcsere stimulációjával magyarázható. Az abszcizinsav anyagcsere érintettségét megerősíti a fazeinsav és neofazeinsav koncentrációjában hidegkezelés hatására bekövetkező, Dicamba jelenlétében különösen markáns növekedés. Ezek inaktív katabolitok, azonban jelenlétük az abszcizinsav szintjében korábban bekövetkezett emelkedésre utal. Gabonanövények magas abszcizinsav szintje és a megnövekedett fagyállóság között pedig több kutatócsoport is mutatott már ki összefüggést. Ez azonban esetünkben nem lehetett pusztán az auxinanalóggal történő kezelés következménye, hiszen kontroll tenyészetekben nem tapasztaltunk olyan mértékű különbséget a Dicambával kezelt és Dicamba-mentes kultúrák abszcizinsav-tartalmában. A Dicambával történő kezelés tehát önmagában nem elegendő a hidegkezelés során megfigyelhető hatások kiváltásához.

Martonvásár, 2012. szeptember 21.



Vashegyi Ildikó, doktorjelölt  
Pannon Egyetem, Molekuláris- és Nanotechnológiák DI