

**A BRASSZINOSZTEROIDOK BIOSZINTÉZISÉBEN
RÉSZTVEVŐ GÉNEK SZEREPÉNEK ÉS
SZABÁLYOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÉZISEK

SZEKERES MIKLÓS

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ,
Növénybiológiai Intézet

2009.

Tartalom

Bevezetés	2
Kutatási háttér	3
Kísérleti rendszerek és célkitűzések	6
Alkalmazott módszerek	7
Eredmények	9
Főbb következtetések	12
Az értekezés alapjául szolgáló publikációk	14
Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények	15
Egyéb közlemények	16
Köszönetnyilvánítás	18

Bevezetés

Életfolyamataik optimalizálásához a növényeknek rugalmasan alkalmazkodniuk kell környezetük változásaihoz. Edényes növényeknél a külső ingereket érzékelő sejtek működését különböző hormonok hangolják össze, koncentráció-gradiens kialakításával biztosítva a megfelelő válaszreakciót. A molekuláris genetikai ismeretek gyors gyarapodásával ismertté váltak a növényi hormonok hatását közvetítő jelátviteli utak, lehetőséget teremtve a szabályozási folyamatok integrált, rendszer szintű vizsgálatára. Ennek során egyre több információval rendelkezhetünk a hormonszintet és annak érzékelését meghatározó folyamatokról, valamint a hormonok kölcsönhatásairól is.

A brasszinoszteroidokat (BR-okat: regulatív hatású növényi hidroxiszteroidokat) mindössze szűk másfél évtizede sorolják a fitohormonok közé. Az első érzékelési és hiánymutánsok azonosítása lehetővé tette a növények fejlődésében játszott esszenciális szabályozó szerepük igazolását, az általuk kontrollált élettani funkciók pontos meghatározását. Egyértelművé vált ennek a hormoncsoportnak a szükségessége a fotomorfogenezis, sejtmegnyúlás, csírázás, fertilitás és többféle környezeti stresszhatásra adott válaszreakció regulációjában. A mutánsok révén nyílt lehetőség a BR bioszintézisben és érzékelésben résztvevő molekuláris komponensek azonosításának megkezdésére is. A kezdeti eredményeket követően felgyorsult kutatásoknak köszönhetően ma ez a növekedést és differenciálódást szabályozó vegyületcsoport a növényi hormonok egyik legrészletesebben karakterizált csoportjának számít. A jelen disszertációban bemutatandó vizsgálatok a BR-ok hatásspektrumának, a bioszintézisükben résztvevő egyes géneknek, illetve ezek szerepének és szabályozásának megismeréséhez járultak hozzá.

Kutatási háttér

A BR-okat csupán szűk másfél évtizede tekintik a növényi hormonok általánosan elismert csoportjának. Bár korábban számos tanulmány foglalkozott szteroid típusú vegyületek lehetséges szabályozó szerepével növényi rendszerekben, amikor 1979-ben ismertté vált az első BR származék, a brassinolid kémiai szerkezete, viszonylag kevés figyelmet kapott ez az erős növekedés-szabályozó hatású vegyületcsoport.

A BR-ok kutatásának korai szakasza az 1960-as évek közepéig nyúlik vissza, amikor egymástól függetlenül az Egyesült Államokban és Japánban is felismerték egy növekedést serkentő, az auxinoktól és gibberellinektől különböző komponens jelenlétét pollen extraktumokban. Az eredetileg brassinnak elnevezett regulátor kémiai természetéről kezdetben ellentmondásos eredmények jelentek meg, de a megbízható és specifikus biológiai tesztek kidolgozása megteremtette az alapot a hatékony izolálási módszerek kialakításához. Ezeknek volt köszönhető, hogy végül több mint 200 kg repce pollenből kiindulva sikerült másfél milligrammnyi tiszta brassinolidot előállítani, és kristályosított formájából kémiai struktúráját megállapítani.

Röviddel a brassinolid felfedezését követően sikerült megoldani e vegyület laboratóriumi szintézisét is. A hatékony szintetikus és analitikai kémiai eljárások kidolgozásával lehetővé vált számos növényfaj BR tartalmának vizsgálata, aminek során mintegy 50 különböző származékot sikerült azonosítani. Ezeknek az analíziseknek az eredményei alapján derült fény arra is, hogy e vegyületek változatossága ellenére legnagyobb mennyiségben kimutatható formáik valamennyi zárvatermő növényben azonosak.

A szintetikus BR formák elérhetősége lehetővé tette ezek élettani hatásának vizsgálatát külsőleg alkalmazott kezelések során. Az ismert biológiai tesztek alkalmazásával meghatározhatóvá vált az egyes származékok relatív biológiai hatásossága, és

azonosíthatók lettek a BR molekulák effektivitásához szükséges strukturális elemek. Másrészt igen sok - egymásnak gyakran ellentmondó - empirikus adat került közlésre természetes, vagy azokkal rokon szerkezetű szintetikus BR formák fiziológiai hatásairól különböző növényi rendszerekben. Ezek a növekedést serkentő hatás mellett elsősorban a stresszhatásokkal szembeni ellenállóképesség fokozódását mutatták, ami a mezőgazdasági célú alkalmazhatóság lehetőségeinek kutatását és kipróbálását indította el.

Az 1990-es évek közepére sikerült meghatározni a BR bioszintézis végtermékének számító brasszinolid kialakulásához vezető legfontosabb átalakulási lépéseket. Az egyes átalakulásokat a viszonylag magas BR tartalmú rózsameténg (*Catharanthus roseus*) sejt kultúrájában, izotóppal jelölt intermedierekből *in vivo* keletkező származékok kimutatásával lehetett azonosítani. Így ismertté vált, hogy a biológiailag aktív BR-ok a nagy mennyiségben előforduló fitoszterolokból kiindulva képződnek számos, elsősorban oxidatív jellegű konverziós lépést követően. Felismerték azt is, hogy a brasszinolid nem szigorúan egymást követő reakciók során jön létre, hanem szintézise legalább két, párhuzamosan haladó reakciólánc mentén folyhat. Az *Arabidopsis*-nak, mint laboratóriumi modellnövénynek az előtérbe kerülésével erre a fajra is kiterjesztették az *in vivo* metabolit-konverziós vizsgálatokat. Ennek eredményei megerősítették a bioszintézissel kapcsolatos korábbi ismereteket, és arra utaltak, hogy ennek menete a magasabbrendű növények körében alapvetően egységes lehet.

Munkánk kezdetekor a BR-okat hatékony növényi növekedésszabályozóknak tekintették, melyek az ismert fitohormonoknál alacsonyabb, nM-os koncentrációban fejtik ki hatásukat. Ismert volt, hogy valószínűleg valamennyi zárvatermő fajban előfordulnak, azonosították számos formájukat, és megoldották több BR származék kémiai szintézisét, kidolgozták a kimutatásukhoz szükséges nagy érzékenységű analitikai módszereket. Sok adat állt rendelkezésre a külsőleg alkalmazott BR kezelés élettani hatásairól,

bár ezek mind endogén BR tartalommal rendelkező kísérleti rendszerekből származtak. És ismertek voltak a BR-ok bioszintézisének fontosabb intermedierei és átalakulási lépései, valamint az is, hogy a szintézisút reakciói a magasabbrendű növények körében valószínűleg erősen konzerváltak.

Mindezen alapvető ismeretek ellenére számos alapvető kérdés tisztázatlan maradt. Nem volt megbízható adat arra vonatkozóan, hogy a BR szabályozás esszenciális-e a növények életfolyamatai szempontjából, és hogy pontosan mik is azok a biológiai funkciók, ezekkel kapcsolatos génműködések, amelyeket ezek a regulatív szteroidok befolyásolnak. Bár a BR bioszintézis menete nagyjából tisztázott volt, nem voltak ismertek az egyes reakciókért felelős enzimek, valamint ezek génjei és működésük szabályozása. Ismeretlen volt, hogy mi határozza meg a BR-ok eloszlását a növényben, és hogy milyen molekuláris komponensek vesznek részt érzékelésükben, hatásuk közvetítésében. Ezen tisztázatlan problémák kísérleti megközelítéséhez égetően szükség volt olyan BR-deficiens mutáns vonalakra, amelyekben a hormon hiányának következményei, illetve az ezért felelős gének megismerhetők, és olyan BR-inszenzitív mutánsokra is, melyek révén a szteroid hormon szabályozás hiányának következményei, valamint a BR érzékelésért és jelátvitelért felelős komponensek meghatározhatók.

Kísérleti rendszerek, célkitűzések

Munkánk során a BR-ok által regulált folyamatok körét, a BR bioszintézisben résztvevő gének funkcióit, valamint működésük szabályozását kívántuk tanulmányozni. Ehhez éppen ismertté váló genom-szekvenciájával és számos elérhető mutánsparkjával az *Arabidopsis thaliana* ideális kísérleti objektumnak ígérkezett. A BR-ok növényen belüli szállítódását, valamint e hormonoknak a termésfejlődésben játszott szerepét paradicsomban vizsgáltuk.

A BR-hiányos *constitutive photomorphogenesis and dwarfism* (*cpd*), valamint *cabbage 1* (*cbb1*) mutánsok lehetőséget adtak a hormonhiány fenotipikus és funkcionális következményeinek tisztázására, a BR-inszenzitív *cabbage 2* (*cbb2*) révén pedig a hormon génexpresszióra gyakorolt hatásáról nyerhettünk információt.

Funkciójuk ismeretében célunk volt a BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD* és *CYP85A2* gének expressziós szabályozásának megismerése. Ehhez a direkt mRNS detektálási módszerek mellett olyan transzgenikus növényeket használtunk, amelyekben ezen gének promóterei a pontos lokalizálást segítő β -glukuronidáz, vagy az *in vivo* detektálást lehetővé tevő luciferáz riporterek kifejeződését szabályozták.

Célunk volt továbbá az eredményeink alapján a BR szintézishez kapcsolódó, de ismeretlen szerepű *CYP90C1* és *CYP90D1* enzimek funkciójának meghatározása. Ehhez célzott módszerrel izolált mutánsok felhasználása mellett elvégeztük a bakulovírus rendszerrel rovarsejtekben kifejeztetett enzimek reakcióinak részletes biokémiai karakterizálását is.

Vizsgálataink a BR bioszintézis génjeinek összetett és precíz expressziós szabályozottságát mutatták, ezért tisztázni kívántuk, hogy ez miként befolyásolhatja az általuk kódolt enzimek által termelődő hormon felhalmozódását. Az endogén BR formák gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízisével kimutatható volt a bioszintetikus gének indukciója és a brasszinolid tartalom növekedése közti szoros kapcsolat.

Alkalmazott módszerek

Vizsgálatainkhoz főként az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) Columbia-0 ökotípusát, valamint ennek mutáns és transzgenikus változatait használtuk. A növényeket üvegházi körülmények között $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten a csírázástól számított négy héten át rövidnappalos (8 óra fény/16 óra sötét), majd ezt követően hosszúnappalos (16 óra fény/8 óra sötét) megvilágítást alkalmazva neveltük. A génexpressziós kísérleteket jórészt egyhetes csíranövényeken végeztük, amelyeket steril körülmények között Murashige-Skoog médiumon növesztettünk, 22°C hőmérsékletet és 12 óra fény/12 óra sötét megvilágítási ciklusokat biztosító nevelőkamrában. A kísérleteinkhez szükséges paradicsom növényeket $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű üvegházban, természetes fényviszonyok mellett tartottuk fenn.

A munkánkhoz szükséges transzgenikus növényvonalakat T-DNS alapú bináris vektorok segítségével, *Agrobacterium*-mediált génátvitellel indukált genomi beépüléssel hoztuk létre. Az elsődleges transzformáns növények szelekcióját és jellemzését követően kiválasztott reprezentatív egyedek vad típussal történt visszakeresztezése után ezek utódaiból a beépített transzgénre nézve homozigóta vonalakat izoláltunk. Az egyes BR-bioszintetikus funkciókban sérült mutánsokat a kölni Max Planck Intézet Koncz Csaba vezette laboratóriumában létrehozott T-DNS inszerciós mutánsparkból azonosítottuk az általuk kidolgozott PCR alapú módszerrel. A kettős mutánsokat az eredeti mutáns vonalak keresztezésével alakítottuk ki.

A közvetlen génexpressziós analízisek során az egyes transzkriptumok stacioner mennyiségeit hasonlítottuk össze. Ehhez általában egyhetes csíranövényekből tisztított össz-RNS mintákat vizsgáltunk Northern-blot hibridizáció, vagy félkvantitatív, reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR módszer segítségével. A génaktivitások pontos lokalizálásához, illetve időbeni követéséhez a promóter régiókat *Escherichia coli* eredetű β -glukuronidáz, vagy szentjánosbogárból származó luciferáz riportergénnel fuzionáltattuk,

és ezen konstrukciók kifejeződését stabil transzgenikus növényekben követtük. A glukuronidáz aktivitás eloszlását hisztokémiai festéssel, mértékét pedig spektrofotometriás méréssel határoztuk meg. A luciferáz aktivitásból származó lumineszcencia intenzitását, annak *in vivo* változásait nagy érzékenységű CCD kamerával készített felvételek alapján kvantitáltuk.

A BR-szabályozott mRNS szintek vizsgálatánál az ún. differential display (DD RT-PCR) analízist alkalmaztuk. A hormonkezelt és kontroll mintákban különböző mértékben felhalmozódó transzkritumoknak megfelelő termékek azonosítását követően ezeket izoláltuk, majd BR reguláltságukat Northern-hibridizációs teszttel ellenőriztük. A validált PCR termékek szekvenciájának meghatározása után a kiválasztott gén teljes cDNS klónját λ fág alapú génbankból izoláltuk plakkhibridizációs módszerrel.

A növényi minták BR tartalmát japán kollaborációs partnereink laboratóriumaiban határozták meg gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízissel. A kvantitatív vizsgálatokat deutériummal jelzett belső standard felhasználásával végezték.

A BR-bioszintetikus citokróm P450-ek biokémiai vizsgálatához ezek cDNS-einek kódoló régióit bakulovírus alapú vektorba klónoztuk, és az enzimeket az ezekkel fertőzött rovarsejt kultúrában termeltettük. Kísérleteinkhez spektrofotometriásan kvantitált P450 tartalmú tisztított mikroszóma preparátumot használtunk. Az *in vitro* reakciók során képződött reakciótermékeket tömegspektrometriás adataik segítségével azonosítottuk, mennyiségük alapján pedig meghatároztuk az átalakulási reakciók enzimkinetikai paramétereit.

Eredmények

A jelen disszertációban bemutatott vizsgálatok kezdetekor az *Arabidopsis* extrém törpe fenotípusú *cpd* mutánsának molekuláris genetikai karakterizálása érdekes új eredményeket ígért, mégis váratlan volt, hogy - részben ezek hatására - egy éven belül a BR-ok növényi hormon jellege általánosan elismertté válik, és hogy kevesebb mint egy évtizeden belül a BR érzékelés valamennyi fontos komponense is azonosítható lesz. Az intenzív és jól összehangolt kutatásoknak köszönhetően mára a BR-ok az egyik legrészletesebben jellemzett fitohormon csoportnak tekinthetők.

Munkánk folyamán elsősorban a BR-ok pontos élettani funkcióit, a bioszintézisükben résztvevő gének és termékeik működését, valamint ezeknek a hormonháztartással való kapcsolatát igyekeztünk felderíteni. Az ennek során elért főbb eredményeink a következők voltak:

(1) Azonosítottuk a törpeséget okozó *cpd* mutáció által inaktivált gént, és meghatároztuk, hogy az általa kódolt CYP90A1 citokróm P450-típusú monooxygenáz a BR bioszintézis esszenciális enzime. A hiánymutáns fenotípusának részletes vizsgálatával pontosítottuk és kibővítettük a BR-ok hatásspektrumára vonatkozó ismereteket, kimutatva szerepüket a sejtmegegyezés, fotomorfogenezis, xilém differenciáció, fertilitás és stressz-rezisztencia regulációjában.

(2) Meghatároztuk a *CPD* gén aktivitásának szervspecifikus mintázatát, megállapítva, hogy kifejeződése elsősorban a differenciálódó levelekre lokalizálható. Kimutattuk, hogy a *CPD* expresszióját a biológiailag aktív BR-ok koncentrációtól függően, egy transzkripciós szintű negatív visszacsatolási mechanizmus révén szabályozzák.

(3) Expressziós vizsgálataink alapján megállapítható volt, hogy a BR bioszintézisben résztvevő valamennyi P450 enzim génje a *CPD*-éhez hasonló végtermékgátlásos szabályozás alatt áll. Az egyes gének hormonválaszának megegyező kinetikája és mértéke összehangolt, azonos működésen alapuló regulációra utalt. A hormonális kontroll fontos fiziológiás szerepét jelzete, hogy egészséges vad típusú növényekben valamennyi BR-bioszintetikus gén működése részlegesen represszált volt.

(4) A biológiailag aktív hormon létrehozásáért felelős CYP85 enzimek génjeinek működésével kapcsolatban tisztáztuk, hogy *Arabidopsis*-ban a *CYP85A1* és *CYP85A2* közül a csírázást követően csak az utóbbi aktív. Különböző promóter-riporter fúziókat hordozó transzgenikus növények segítségével feltérképeztük a két CYP85 gén működésének szervenkénti és szöveti eloszlását, megállapítva, hogy a *CPD*-hez hasonlóan ezek is a differenciációs folyamatok során aktiválódnak. Paradicsomban a *Dwarf* gén kifejeződésének vizsgálatakor az *Arabidopsis* CYP85 génekéhez nagyon hasonló fejlődési és szervspecifikus mintázatot találtunk. Nagymértékű *Dwarf* indukciót, és ezzel párhuzamosan a biológiailag legaktívabb BR formának tekintett brasszinolid erőteljes átmeneti felhalmozódást észleltünk a termésfejlődés során.

(5) *Arabidopsis*-ban kimutattuk, hogy a BR bioszintézis kulcsenzimeit kódoló *CPD* és *CYP85A2* gének működése napszakosan változik, és hogy ezt a *CPD* esetében bizonyíthatóan a belső cirkadián ritmus és a fény szabályozás együttesen biztosítja. Hullámhossz-specifikus megvilágítással és fotoreceptor-deficiens mutánsok felhasználásával meghatároztuk, hogy a fény hatása elsődlegesen a fitokrómoktól függő jelátviteli rendszerek révén érvényesül. Megállapítottuk, hogy a bioszintetikus gének reggeli indukcióját a növényekben erős, tranziens brasszinolid felhalmozódás követi. A *CPD* expresszió fény szabályozása kapcsán azt is megfigyeltük, hogy a fényviszonyok erősen befolyásolják a gén BR represszálhatóságát.

(6) Genetikai és biokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy az *Arabidopsis* CYP90C1 és CYP90D1 enzimei redundáns szerepű szteroid C-23 hidroxilázok. Mindkét enzim többféle szubsztrát átalakítására is képes, és ezek hidroxilációját erősen differenciált kinetika szerint katalizálják. A CYP90C1 és CYP90D1 szubsztrát-preferenciái, valamint addig ismeretlen bioszintetikus intermedierek észlelése alapján egy olyan új, enzimológiai adatokra alapozott bioszintetikus sémát vezettünk le, amelyben C-23 hidroxilációs söntök révén a BL a korábbi modellben feltételezettnél kevesebb lépésben és hatékonyabb reakciók során jöhet létre.

(7) DD RT-PCR szűréssel azonosítottuk a BR hatásra korai válaszként represszálódó, kitin által indukálható *BRH1* gént, amely egy ismeretlen funkciójú RING-H2 proteint kódol. Mivel több hasonló szerkezetű RING-H2 E3 ubikvitin-ligáz komplexek alegysége, feltételeztük, hogy a BRH1 a BR és patogén-függő szignálutak kapcsolatát biztosító ubikvitinációs szabályozásban vehet részt.

Főbb következtetések

A BR-ok bioszintézisében meghatározó jelentőségűek a citokróm P450 enzimek CYP85 és CYP90 családjába tartozó monooxygenázok. Ezek valamennyi tagjának kifejeződését végtermék-gátláson alapuló, a transzkripció szintjén ható kontroll szabályozza. Eredményeink azt mutatták, hogy a BR-bioszintetikus gének működésének ez a specifikus hormonális szabályozása fontos szerepet játszik a fiziológias hormonszint fenntartásában. Bár több fitohormon csoport esetében leírták bioszintézisük végtermék-visszacsatolós regulációját, a BR-ok esetében ez egyedülálló módon valamennyi CYP85 és CYP90 gén összehangolt, azonos mechanizmuson alapuló szabályozása révén valósul meg.

Vizsgálataink kimutatták, hogy más hormonokkal ellentétben a BR-ok elsődlegesen szintézisük közvetlen közelében hatnak. Ez különösen fontossá teszi a hormontermelésért felelős bioszintetikus gének kifejeződésének finoman differenciált szerv- és szövetspecifikus regulációját. Adataink egyértelműen azt mutatták, hogy a szintetikus folyamatban meghatározó szerepű *CPD* és *CYP85A2* gének indukciója időben és helyileg is egybeesik a növény fontos differenciációs és morfogénikus folyamataival. Ennek megfelelően erős kifejeződés volt tapasztalható a csírázás és a hipokotil-megnyúlás folyamán, kifejlett növényekben pedig a merisztémákban, valamint a kialakuló levelekben és reproduktív szervekben. A hormontartalom meghatározásával kimutatható volt, hogy a bioszintetikus gének aktiválódása együtt jár a biológiailag aktív BR formák lokális felhalmozódásával. A paradicsom termésének fejlődése során az aktív BR forma szintéziséért felelős enzimet kódoló *CYP85A2* gén indukciója a hormontartalom erős átmeneti emelkedésével járt, elsősorban a fejlődő magvak környezetében.

A *CPD* és *CYP85A2* gének kifejeződésében karakteres napszakos szabályozás is megfigyelhető volt. A magasabb expressziós szintje miatt könnyebben vizsgálható *CPD* gén

esetében kimutattuk, hogy ezt két alapvető tényező: a növény endogén cirkadián ritmusa, és a ciklusosan váltakozó megvilágítás határozza meg. Eredményeink alapján a fény induktív hatása alapvetően a fitokróm fotoreceptorok közvetítésével érvényesül. Azt találtuk, hogy a reggeli indukciót követően nagymértékben megnőtt a csíranövények brassinolid tartalma, ami a *CPD* expresszió napszakos szabályozásának a hormonszintézisre gyakorolt hatására utalt. Ez összhangban áll azzal, hogy a csíranövények megnyúlása is jellegzetes napszakos periodicitást mutat, valamint hogy a cirkadián szabályozásban sérült mutánsok növekedési rendellenességeket is mutatnak. Adatainkat megerősítik azok a legfrissebb közlemények, amelyek a növekedést serkentő hormonok szintéziséért és érzékeléséért felelős gének koordinált napszakos regulációjáról számolnak be.

Az átfedő bioszintetikus funkciót ellátó CYP90C1 és CYP90D1 enzimek karakterizálása során kimutatott új konverziós lépések alapján valószínűsíthető volt, hogy a brassinolid szintézisének fő útvonala korábban elfogadott bioszintetikus sémától eltérően egy C-23 hidroxilációs söntön keresztül, a klasszikus reakcióláncnál kevesebb lépésben valósul meg. Ezt megerősítik a CYP90 monooxygenázok mindegyikéről rendelkezésre álló enzimkinetikai adatok, a hidroxilációs sönt valamennyi intermedierének jelenléte a növényi mintákban, valamint az alternatív korai C-6 oxidációs út ineffektivitásának kísérletes igazolása a késői C-6 oxidációban sérült mutáns *Arabidopsis*ban.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, **Szekeres M**, Willmitzer L, Altmann T (1996) Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J* 9: 701-713 [IF: 5,666]

Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171-180 [IF: 40,997]

Mathur J, Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, Schell J, Koncz C, **Szekeres M** (1998) Transcription of the *Arabidopsis* *CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14: 593-602 [IF: 5,765]

Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnár G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, **Szekeres M** (2002) Regulation of transcript levels of the *Arabidopsis* cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 130: 504-513 [IF: 5,800]

Molnár G, Bancoş S, Nagy F, **Szekeres M** (2002) Characterisation of *BRH1*, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 127-133 [IF: 2,960]

Castle J, **Szekeres M**, Jenkins G, Bishop GJ (2005) Unique and overlapping expression patterns of *Arabidopsis* *CYP85* genes involved in brassinosteroid C-6 oxidation. *Plant Mol Biol* 57: 129-140 [IF: 3,328]

Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K, Harrison K, Jones JGD, Kaneta T, Kamiya Y, **Szekeres M**, Bishop GJ (2005) Patterns of *Dwarf* expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *Plant J* 42: 262-269 [IF: 6,969]

Bancos S, Szatmári AM, Castle J, Kozma-Bognár L, Shibata K, Yokota T, Bishop GJ, Nagy F, **Szekeres M** (2006) Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 299-309 [IF: 6,125]

Ohnishi T, Szatmári AM, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K, **Szekeres M**, Mizutani M (2006) C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 18: 3275-3288 [IF: 9,868]

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Koncz C, **Szekeres M**, Altmann T, Mathur J (1997) Nucleic acid molecules encoding cytochrome P450-type proteins involved in the brassinosteroid synthesis in plants. (szabadalom; EP0889963/US5952545)

Szekeres M, Koncz C (1998) Biochemical and genetic analysis of brassinosteroid metabolism and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 36: 145-155 [IF: 1,374]

Szekeres M (2003) Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci* 8: 102-104 [IF: 13,405]

Bishop G, Nomura T, Yokota T, Montoya T, Castle J, Harrison K, Kushiro T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Bancos S, Szatmári A-M, **Szekeres M** (2006) Dwarfism and cytochrome P450-mediated C-6 oxidation of plant steroid hormones. *Biochem Soc Trans* 34: 1199-1201 [IF: 2,962]

Szekeres M, Bishop GJ (2006) Integration of brassinosteroid biosynthesis and signaling. In: *Plant hormone signaling*. Annual Plant Reviews (P Hedden, S Thomas, eds), 67-92, Blackwell, Oxford

Hategan L, Bindics J, **Szekeres M** (2008) Developmentally regulated expression of the BRI1 brassinosteroid receptor in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol Szegediensis* 52: 57-58

Egyéb közlemények
a kandidátusa cím elnyerése óta

Szekeres M, Droux M, Buchanan BB (1991) The ferredoxin-thioredoxin reductase variable subunit gene from *Anacystis nidulans*. J Bacteriol 137: 1821-1823 [IF: 3,759]

Széll M, **Szekeres M**, Ádám É, Fejes E, Nagy F (1992) Cis-regulatory elements responsible for the tissue-specific expression of the wheat Cab-1 gene. In: Regulation of chloroplast biogenesis (JH Argyroudi-Akoyunoglu, ed.) pp 57-61, Plenum Press, New York

Ádám É, Széll M, **Szekeres M**, Schäfer E, Nagy F (1994) The developmental and tissue-specific expression of tobacco phytochrome-A genes. Plant J 6: 283-293 [IF: 5,947]

Szekeres M, Haizel T, Ádám É, Nagy F (1995) Molecular characterization and expression of a tobacco histone H1 cDNA. Plant Mol Biol 27: 597-605 [IF: 3,089]

Széll M, Haizel T, Dallman G, **Szekeres M**, Nagy F (1995) The tobacco SUP1 cDNA (EMBL L38828 and L38829) encodes an EF-1-alpha-related GTP-binding protein with high homology to the yeast omnipotent suppressor (SUP) proteins. Plant Physiol 108: 1748-1749 [IF: 3,825]

Máté Z, Sass L, **Szekeres M**, Vass I, Nagy F (1998) UV-B induced differential transcription of *psbA* genes encoding D1 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. In: Photosynthesis: Mechanisms and effects (G Garab, ed.) vol. 3, pp 2337-2340, Kluwer Acad Publ

Máté Z, Sass L, **Szekeres M**, Vass I, Nagy F (1998) UV-B induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. J Biol Chem 273: 17439-17444 [IF: 7,199]

Francová K, Sura M, Macek T, **Szekeres M**, Bancos S, Demnerova K, Sylvestre M, Mackova M (2003) Generation of plants carrying bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. Fresenius Environ Bull 21: 309-313 [IF: 0,325]

Surá M, Macková M, Borovka R, Frančová K, **Szekeres M**, Macek T (2004) Cloning of bacterial PCB-degrading gene into the plants. Proceedings ESEB 2004, (W. Verstraete ed.), pp 749-752, Taylor and Francis Group, London

Surá M, **Szekeres M**, Bancos S, Borovka R, Francova K, Macek T, Sylvestre M, Mackova M (2004) Cloning of bacterial PCB degradative genes to plants. Int Biodeter Biodegr 53: 247-248 [IF: 0,835]

Macek T, Surá M, Pavliková D, Francová K, Scouten WH, **Szekeres M**, Sylvestre M, Macková M (2005) Can tobacco have a potentially beneficial effect to our health? Zeitschr Naturforsch 60C: 292-299 [IF: 0,602]

Novakova M, Mackova M, Chrastilova Z, Viktorova J, **Szekeres M**, Demnerova K, Macek T (2009) Cloning the bacterial *bphC* gene into *Nicotiana tabacum* to improve the efficiency of PCB phytoremediation. Biotechnol Bioeng 102: 29-37 [IF: 2,936]

Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönettel tartozom mindazoknak, akik a disszertációmban bemutatott, mintegy másfél évtizedes munka eredményeinek létrejöttéhez hozzájárultak.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni a sokoldalú segítséget és támogatást Koncz Csabának és Nagy Ferencnek, akiknek a laboratóriumaiban vizsgálataimat végeztem. Hálával tartozom a kísérletek megvalósításában meghatározó szerepet vállaló munkatársaimnak: Simona Bancoşnak, Godza Blankának, Lidia Haţegannak, Koncz Zsuzsannának, Kozma-Bognár Lászlónak, Jaideep Mathurnak, Molnár Gergelynek, Németh Kingának, Toshiyuki Ohnishinek és Szatmári Anna-Máriának, valamint segítőkész együttműködésükért Günther Adamnak, Thomas Altmannak, Gerard Bishopnak, Shozo Fujiokanak, Masaharu Mizutaninak, Rédei Györgynek, Jozef Schellnek, Suguru Takatsutonak és Takao Yokotanak. Köszönök minden támogatást a Foto- és Kronobiológiai Csoport valamennyi munkatársának, különösen Ádám Évának, Gyula Péternek és Kevei Évának, továbbá a kísérletek elvégzéséhez nyújtott megbízható technikai segítséget Petőné Jószai Katalinnak, Hajó Róbertnének, Koósné Majzik Hedvignek, Nagy Rózának, Valkai Ildikónak és Veres Gabriellának. Munkámhoz biztos háttérrel teremtett családom támogatása, amit ezúton is szeretnék megköszönni.