# A BRASSZINOSZTEROIDOK BIOSZINTÉZISÉBEN RÉSZTVEVŐ GÉNEK SZEREPÉNEK ÉS SZABÁLYOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZEKERES MIKLÓS

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT, NÖVÉNYBIOLÓGIAI INTÉZET

2009.

## TARTALOMJEGYZÉK

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
<ul> <li>2.1. A brasszinoszteroidok</li> <li>2.1.1. Szerkezeti tulajdonságok</li> <li>2.1.2. Természetes BR-ok</li> <li>2.1.3. Élettani hatások</li> <li>2.1.4. BR érzékelés és jelátvitel</li> <li>2.1.5. A BR-ok gyakorlati jelentősége</li> <li>2.2. A BR-ok bioszintézise</li> <li>2.2.1. A bioszintézis enzimei</li> <li>2.2.2. A BR bioszintézis enzimei</li> <li>2.2.2.1. Citokróm P450 monooxigenázok</li> <li>2.2.2.2. A BR bioszintézis enzimeinek katalitikus tulajdonságai</li> <li>2.2.2.3. A bioszintézis sebesség-meghatározó lépései</li> <li>2.3. Az endogén BR szint regulációja</li> <li>2.3.1. Transzport és inaktiváció</li> </ul>	3 5 5 7 10 11 13 15 18 19 20 20
<ul> <li>2.3.2. A bioszintezis genjeinek transzkripcios szabalyozasa</li> <li>2.3.2.1. Végtermékgátlás</li> <li>2.3.2.2. Fejlődési stádiumtól függő szabályozás</li> <li>2.3.2.3. Szervspecifikus reguláció</li> <li>2.4. Az élettani funkciók hormonális szabályozása</li> <li>2.4.1. Regulációs folyamatok az egyedfejlődés szintjén</li> <li>2.4.2. Napszakos szabályozás</li> <li>2.4.2.1. A növények hormonális folyamatainak diurnális szabályozása</li> <li>2.4.2.2. Cirkadián reguláció</li> </ul> 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21 22 23 23 23 23 24 24 24 26 30
<ul> <li>3.1. Vegyszerek, szolgáltatások</li> <li>3.2. Növényi anyag és nevelési körülmények</li> <li>3.2.1. Felhasznált növényvonalak</li> <li>3.2.2. Nevelési körülmények</li> <li>3.2.2.1. <i>In vitro</i> kultúrák</li> <li>3.2.2.2. Üvegházi körülmények</li> <li>3.3. Transzgenikus növények előállítása</li> <li>3.3.1. Génkonstrukciókat hordozó növényi vektorok kialakítása</li> </ul>	30 31 32 32 32 33 33
<ul> <li>3.3.1. Genkonstruktiokat hordozo novenyi vektolok klakitasa</li> <li>3.3.2. Stabil transzformáns növényvonalak létrehozása</li> <li>3.4. Mutánsizolálás</li> <li>3.5. Génexpressziós vizsgálatok</li> <li>3.5.1. Az mRNS-szintek meghatározása direkt módszerekkel</li> <li>3.5.1.1. RNS izolálás</li> <li>3.5.1.2. Northern-blot hibridizáció</li> <li>3.5.1.3. Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis</li> </ul>	33 34 35 35 35 35 35 36

3.5.1.3. Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis

3.5.2. Promóter-aktivitás vizsgálata riportergének segítségével	37
3.5.2.1. β-Glukuronidáz-alapú analízisek	37
3.5.2.2. Luciferáz-alapú vizsgálatok	37
3.6. "Differential display" mRNS analízis	38
3.7 Endogén BR-ok mennyiségi analízise	39
3 7 1 BR-ok izolálása és tisztítása növényi mintákból	39
3.7.2. Gázkromatográfiával kancsolt tömegsnektrometriás analízis	30
3.8. Heterológ rendszerben kifejeztetett citokróm P/150 enzimek jellemzése	30
2.9.1 Hotorológ ovproczáltotác rovorcoitokhon	20
3.0.1. Helefolog expresszallalas tovarsejtekben	39
	40
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	41
4.1. A BR szintézist és szignálátvitelt érintő mutánsok azonosítása és jellemzése	41
4.1.1. Az Arabidopsis cpd mutánsának karakterizálása	41
4.1.1.1. A cpd mutáns fenotípusának jellemzése	42
4.1.1.2. A CPD gén azonosítása	44
4.1.1.3. A CPD kifejeződésének hatása egyes "stresszgének" aktivitására	47
4.1.1.4. A CPD gén egy citokróm P450 monooxigenázt kódol	49
4.1.1.5. A <i>cpd</i> mutáns fenotípusának helvreállítása BR származékokkal	49
4 1 1 6 BR kezelés hatása más <i>Arabidonsis</i> hipokotil mutánsokra	52
4 1 1 7 A cod mutáns vizsgálatának jelentősége	53
4 1 2 Az Arabidonsis chb mutánsok jellemzése	55
4.1.2.1.2 A chh mutánsok de-etiolált fenotínusúsk	56
A 1 2 2 Δ chh mutánsok genetikai vizsgálata	57
4.1.2.2. Fitobormonok batáca a chh mutánsok fonotínucára	59
4.1.2.3. Thoromotion indiasa a coo mutansok renotipusara	50
4.1.2.4. A COD Mulaciók a DR-10990 Novekedesie Halitak	50
4.1.2.5. A COD mulaciók genexpressziós nalasa	02
4.1.2.0. A BR-0K a monormonok onalio csoponjanak tekinthetok	04
4.2. A BR-DIOSZINTETIKUS P450 genek szabalyozasa	67
4.2.1. A CPD gen BR-luggo kilejezodese	07
4.2.1.1. A CPD gen aktivitasa BL-dai represszalnato	67
4.2.1.2. A CPD BR represszioja de novo fenerjeszintezist igenyel	68
4.2.1.3. A CPD expresszió fejlődés- és szervspecifikus szabályozása	70
4.2.1.4. A BR bioszintézis intermediereinek regulációs hatása	71
4.2.1.5. A CPD expresszió és a BR bioszintézis kapcsolata	74
4.2.2. Az Arabidopsis BR-bioszintetikus P450 génjeinek expressziója	77
4.2.2.1. A BR bioszintézisben résztvevő P450 gének evolúciós rokonsága	77
4.2.2.2. A CYP85 és CYP90 gének negatív visszacsatolásos kontrollja	79
4.2.2.3. A CYP85 és CYP90 mRNS-szintek változása a csírázás folyamán	81
4.2.2.4. A transzkriptumok differenciált szervspecifikus felhalmozódása	82
4.2.2.5. Az endogén BR-ok szervspecifikus előszlása	84
4.2.2.6. A BR szintézis visszacsatolásos szabálvozásának élettani szerepe	85
4.2.3. Az Arabidopsis CYP85 génieinek differenciált működése	87
4 2 3 1 A CYP85 gének időbeni kifejeződése	88
4 2 3 2 Szerv- és szövetspecifikus expresszió	90
1 2 3 3 A CVP85 gének 5' szabályozó szekvenciáinak összebasonlítása	Q1
4234 A paradirsom Dwarf GUS fúzió kitalaződása Arabidonsisban	03
A 2 3 5 A CVD85A1 de CVD85A2 gének funkciómogooztégo	04
4.2.0.0. A OTFODATES OTFODAL YEHEK IUHKUUHEYUSZIASA	94 06
4.2.4. A paraulusulli Dwall yelijellek illukuuese	90
4.2.4.1. A Dwall gen expressiona CSITanovenyekben	90
4.2.4.2. A Dwall kilejezouese a vilag- es termestejioues soran	99
4.2.4.3. Eroteijes bl teinaimozodas a termeseres soran	100

4.2.4.4. A BR-ok vaszkuláris transzportjának hiánya	101
4.2.4.5. A Dwarf gén szerepe a reproduktív fejlődésben	102
4.2.5. A BR bioszintézis napszakos regulációja	104
4.2.5.1. A BR-bioszintetikus gének diurnális ciklusú kifejeződése	105
4.2.5.2. A CPD expresszió fény általi és cirkadián szabályozása	106
4.2.5.3. A CPD gén fényregulációja fitokróm jelátvitelt igényel	108
4.2.5.4. A CPD aktivitás diurnális ciklusa független a BR szabályozástól	110
4.2.5.5. A növények BR tartalmának napszakos változása	112
4.2.5.6. Folyamatos sötét kezelés fokozott BR-érzékenységet eredményez	115
4.2.5.7. A BR bioszintézis napszakos szabályozottságának jelentősége	116
4.3. A CYP90C1 és CYP90D1 enzimek bioszintetikus funkciója	120
4.3.1. CYP90C1- és CYP90D1-deficiens mutánsok	121
4.3.1.1. CYP90C1- és CYP90D1-hiányos mutánsok izolálása	121
4.3.1.2. A mutáns vonalak fenotípusának jellemzése	122
4.3.2. Heterológ rendszerben kifejeztetett CYP90C1 és CYP90D1 vizsgálata	125
4.3.2.1. Expresszáltatás rovar sejtekben	125
4.3.2.2. A CYP90C1 és CYP90D1 enzimek katalitikus aktivitása	126
4.3.2.3. Enzimkinetikai jellemzők	127
4.3.3. A CYP90C1 és CYP90D1 hiányának hatása a BR tartalomra	129
4.3.4. A cyp90c1cyp90d1 kettős mutáns menekítése BR intermedierekkel	131
4.3.5. A CYP90C1 és CYP90D1 szerepe a BR szintézisben	133
4.3.6. A BR bioszintézis C-23-hiroxilációs söntjei	134
4.4. Egy BR-regulált RING-H2 gén karakterizálása	137
4.4.1. A BRH1 cDNS izolálása és jellemzése	138
4.4.2. A BRH1 gén hormonális szabályozása	139
4.4.3. Elicitor-indukált BRH1 expresszió	141
4.4.4. A BRH1 expresszió fenotipikus hatása	142
4.4.5. A BRH1 lehetséges funkciója	144
5 ÖSSZEFOGLALÁS	147
3. 0002E1 00EAEA0	147
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	149
7. IRODALOMJEGYZÉK	150
8. FÜGGELÉK	165
9.1. A disszortásiá slopiául szolgálá közlemények	164
<ul> <li>8.2. A disszertáció anyagához kapcsolódó összefoglaló jellegű publikációk</li> </ul>	164

# RÖVIDÍTÉSEK

22-OH-3-on	22-hidroxiergoszt-3-on
22-OH-4-en-3-on	22-hidroxiergoszt-4-en-3-on
22,23-diOH-4-en-3-on	22,23-dihidroxiergoszt-4-en-3-on
BL	brasszinolid
BR	brasszinoszteroid
BRRE	brasszinoszteroid-reszponz elem
C24	Arabidopsis thaliana C24 ökotípus
Col-0	Arabidopsis thaliana Columbia-0 ökotípus
DD	folyamatos sötét ("dark/dark")
DD RT-PCR	"differential display" reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR
GC-MS	gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
GFP	kristálymedúza (Aequorea victoria) zöld fluoreszcens protein
GUS	Esherichia coli β-glukuronidáz
LD	12 óra fehér fény, 12 óra sötét ("light/dark") megvilágítási ciklus
Ler	Arabidopsis thaliana Landsberg erecta ökotípus
LL	folyamatos fehér fény ("light/light") megvilágítás
LRRK	leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptor kináz
LUC	szentjánosbogár (Photynus pyralis) luciferáz
P450	citokróm P450 monooxigenáz
RT-PCR	reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR
Ws-2	Arabidopsis thaliana Wassilewskija ökotípus

## 1. 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 válaszreakciókat. 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 (regulatív hatású növényi hidroxiszteroidokat) mindössze szűk másfél évtizede sorolják a fitohormonok közé. Az első érzékelési és hiánymutánsok azonosítását 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 brasszinoszteroidok hatásspektrumának, a bioszintézisükben résztvevő egyes géneknek, illetve ezek szabályozásának megismeréséhez járultak hozzá.

Az értekezés tematikája, a vizsgálatok céljainak és eredményeinek bemutatása a megjelent publikációkra épül. A kísérleti munka mintegy másfél évtizedre nyúlik vissza, ami a növénybiológia gyors fejlődése mellett igen hosszú időnek számít. Különösen jelentősek a változások egy olyan területen, amelyek kutatása vizsgálataink kezdetekor szinte az alapokról indult. Ezért a kísérletek eredeti gondolatmenetének, logikájának megőrzése végett azok háttereként az akkor aktuális ismeretek szerepelnek. A megvitatások során viszont az eredmények mindig naprakész kontextusban kerülnek bemutatásra.

Egyes vizsgálataink szervesen kapcsolódtak korábbi, az értekezésben is szereplő eredményeinkhez, ezért ezek leírásának bevezetésében esetenként saját munkáinkra is hivatkozni kellett. Publikált eredmények esetén ezek egyszerűen mint saját adatok szerepelnek, más idézetekkel együtt mindig időrendi sorrendben.

Hazai BR vonatkozású publikációk hiányában a disszertációban szereplő brasszinoszteroid formáknak nincsenek elfogadott, vagy akár csak publikált magyar nevei. A szerves kémiában bevett gyakorlatnak megfelelően a brasszinoszteroidok triviális neveit is általában az eredeti forrásként szolgáló növénynemzetségek latin neveiből (pl. *Brassica*, *Catharanthus*, *Thea*, *Castanea*) származtatták. A magyar nyelvű biokémiai publikációk gyakorlatának megfelelően az értekezésben a nemzetközi szakirodalomban használt elnevezéseknek a Kémiai helyesírási szótárban (Műszaki Könyvkiadó, 1982) megadott elvek szerint magyarosított formái szerepelnek.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 2.1. A brasszinoszteroidok

Az eredetileg Mitchell és mtsai (1970) által brasszinokként leírt brasszinoszteroidok (BR-ok) iránti érdeklődést elsősorban markáns növekedésserkentő tulajdonságuk inspirálta. Az azóta eltelt időszakban ezek a kutatások látványos eredményeket produkáltak, és mára a BR-ok a növények egyik legjobban ismert, hatásmódjuk tekintetében is részletesen jellemzett hormoncsaládjának számítanak (Vert és mtsai, 2005).

A BR-ok tanulmányozásának jelentős lendületet adott, amikor egy ambiciózus, 200 kg repce (*Brassica napus*) pollenből kiinduló tisztítási folyamat során sikerült izolálni és kristályosítani 4 mg-nyi brasszinolidot (BL), a brasszin biológiai aktivitásáért felelős vegyületet, és meghatározni annak pontos kémiai szerkezetét (Grove és mtsai, 1979). A polihidroxilált szteroidok közé tartozó BR-oknak azóta több mint 50 természetben előforduló formája vált ismertté (Bajguz és Tretyn, 2003).

Az élettani funkciók és a hatásmechanizmus vizsgálata szempontjából nagy jelentőségű lépés volt az első BR-deficiens (Li JM és mtsai, 1996; saját munkánk) és - inszenzitív (Clouse és mtsai, 1996) mutánsok izolálása. Ezeknek a mutánsoknak a segítségével pontosan megismerhetővé váltak a BR-ok által szabályozott biológiai folyamatok, és rajtuk keresztül e vegyületeknek az egyedfejlődésben játszott esszenciális szerepe. Rövid időn belül általánosan elfogadottá vált, hogy a korábban csak növekedésszabályozóként számontartott BR-ok egy új növényi hormoncsaládnak tekintendők (Yokota, 1997; Clouse és Sasse, 1998).

## 2.1.1. Szerkezeti tulajdonságok

A BR-ok az edényes növényekben általánosan előforduló, erős növekedésserkentő hatású szteroidok. Számos ide tartozó vegyület azonosítása révén megállapítható volt, hogy valamennyi BR 5α-kolesztán vázú hidroxilált szteroid (Mandava, 1988). Mai ismereteink szerint ezek közül tényleges biológiai aktivitással csupán a BR bioszintézis végtermékének számító BL, és az ennek közvetlen prekurzorául szolgáló kasztaszteron (Yokota és mtsai, 1982) rendelkezik. A BL (racionális elnevezése szerint: 22R,23R,24S-2α,3α,22,23-tetrahidroxi-24-metil-B- homo-7-oxa-5α-kolesztán-6-on) molekulának az ismert szteroidok közt egyedülálló tulajdonsága, hogy héttagú, heterociklusos, oxa-lakton típusú B gyűrűvel rendelkezik. A két bioaktív BR szerkezete, valamint a szteroid váz szénatomjainak számozása és az anellált gyűrűk jelölése az 1. ábrán látható. A közvetlen hormonhatású vegyületeken kívül a BR-ok közé sorolják még a fitoszterolokból kiinduló BL szintézisút intermediereit, valamint ezek acilált, ill. glikozilált konjugátumait is (Bajguz és Tretyn, 2003).





Az egyes BR származékok a szteroid oldallánc 24-es szénatomjának alkilációs állapotában, valamint az oxigén tartalmú szubsztituensek számában és helyzetében különböznek egymástól (Yokota, 1997). Élettani szempontból és mennyiségileg is legjelentősebbek a  $C_{28}$  (C-24-metilált) vázzal rendelkező BR-ok. A molekulák szénatomjai közül a C-3 minden esetben hidroxilált, és további hidroxiláció fordulhat elő a C-2, C-22 és C-23 helyzetben is. Oxo-, valamint oxa-csoport esetenként a hatos, ill. hetes pozíciókban találhatók (1. ábra). A BR-ok strukturális alapú pontos, a prekurzoroktól és más hidroxiszteroidoktól való világos elkülönítést lehetővé tevő definícióját Bishop és Yokota (2001) javaslata alapján fogadták el. Eszerint azok a szteroidok tartoznak ebbe a vegyületcsoportba, amelyek az 5 $\alpha$ -kolesztán vázon a C-3 hidroxiláción kívül még egy, vagy több oxigén tartalmú szubsztituenst hordoznak a C-2, C-6, C-22, és/vagy C-23 pozíciókban.

#### 2.1.2. Természetes BR-ok

A BR-ok az edényes növények körében általánosan elterjedt szabályozó vegyületek, amelyeket emellett néhány alacsonyabbrendű szervezetből (pl. mohák, zöldalgák) is ki tudtak mutatni. Egy közelmúltban megjelent áttekintés (Bajguz és Tretyn, 2003) 59 természetes BR-ot tart számon. Bár e vegyületek többségét csupán egy, vagy néhány növényfajban találták meg, a hormonális hatásért elsődlegesen felelős C<sub>28</sub> vázú bioaktív BR-ok, és ezek bioszintetikus intermedierei minden vizsgált növény szervezetében előfordultak.

Máig nem tisztázott kérdés, hogy a kasztaszteronénál erősebb élettani hatású BL mennyire tekinthető általánosan elterjedtnek a magasabbrendű növények körében. Számos fajból mindeddig nem sikerült kimutatni ezt a vegyületet, és feltételezik, hogy ezekben a szervezetekben a kasztaszteron lehet az egyedüli bioaktív BR. Ugyanakkor a BL igen alacsony (ng/kg nagyságrendű) fiziológiás szintje miatt elképzelhető, hogy detektálása esetenként csupán a felhasznált analitikai módszerek érzékenységének korlátai miatt nem volt lehetséges. A korábban BL-ot nem termelő növényekként számontartott *Arabidopsis*ban és paradicsomban (*Solanum lycopersicum*) is csak nemrég sikerült kimutatni ennek a BR formának a jelenlétét (Fujioka és mtsai, 1998; saját adataink). Viszont mindeddig egyetlen egyszikű fajban sem detektáltak BL-ot, még a rendszerint hormont felhalmozó BR-inszenzitív mutánsaik esetében sem (Noguchi és mtsai, 1999a). Ennek alapján pl. rizsben (*Oryza sativa*) bizonyítottnak látszik, hogy BR bioszintézisének végterméke a kasztaszteron (Kim BK és mtsai, 2008).

## 2.1.3. Élettani hatások

A BR-ok fiziológiai hatásai közül legszembeötlőbb, hogy a növényeken erőteljes növekedést, megnyúlást váltanak ki. Ennek alapján az auxin és gibberellin hormoncsoportokkal együtt a növekedés-serkentő fitohormonok közé sorolhatók. E funkciójukkal összhangban a BR-deficiens (a hormon szintézisében sérült) mutánsok markáns törpe fenotípust mutatnak, amely ugyanakkor BR kezeléssel a vad típuséhoz hasonlóvá helyreállítható (Clouse, 1996b). A BR-hiányos növények szöveti szintű vizsgálata kimutatta, hogy a törpe fenotípus kialakulását a jelentősen csökkent mértékű sejtmegnyúlás és xilém differenciáció okozza (saját adataink; Azpiroz és mtsai, 1998). A bioszintézis mutánsainak karakterizálása során ismertté váltak a BR-ok további fontos regulatív funkciói is. Az erős fenotípusú mutánsok ún. konstitutív fotomorfogenikus fejlődést mutattak, melynek során a csíranövényeknél sötétben is rövid hipokotilt és nyitott szikleveleket figyeltek meg. E morfológiai jegyeken túlmenően kimutatható volt a normális sötétfejlődés (szkotomorfogenezis) során egyébként represszált, sejtmagi fényindukált géneknek (pl. a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz kis alegységét kódoló *RBCS*, valamint a klorofill a/b-kötő fehérjét kódoló *CAB*) a vad típuséhoz viszonyítva jóval magasabb szintű kifejeződése (Chory és mtsai, 1991; saját adataink; Azpiroz és mtsai, 1998).

Ezeken kívül is több fontos életfolyamat szabályozásában vesznek részt a BRok. A hormon súlyos deficienciáját okozó mutánsoknál a pollenfejlődés visszamaradása miatt hímsterilitás alakult ki (Chory és mtsai, 1991; saját adataink), és a BR-ok megfelelő szintje a csírázás biztosításához is szükséges (Steber és McCourt, 2001). A termés kialakulása és korai fejlődése során a bioaktív BR-ok jelentős felhalmozódását írták le paradicsomban, szőlőben (*Vitis vinifera*) és borsóban (*Pisum sativum*) is (saját adataink; Symons és mtsai, 2006; Nomura és mtsai, 2007). Mindezek az eredmények a BR-oknak a reproduktív fejlődésben játszott fontos regulatív szerepére utalnak.

A BR-okkal kapcsolatos kutatások kezdeteitől ismert volt, hogy ezek a vegyületek fokozni képesek а növények ellenállóképességét bizonyos stresszhatásokkal, pl. vízhiánnyal, gyors hőmérsékleti, ill. ozmotikus változásokkal szemben (Mandava, 1988; Kagale és mtsai, 2007; Bajguz és Hayat, 2009), és ezen protektív tulajdonságukon alapul mezőgazdasági célú felhasználásuk is (Kamuro és Takatsuto, 1998). A BR-deficiens Arabidopsis mutánsokban megfigyelhető volt több tipikusan stresszindukált gén fokozott kifejeződése (saját adataink), vad típusú növényekben pedig BR kezeléssel jelentősen befolyásolni lehetett ezen gének stresszreszponzív expresszióját (Kagale és mtsai, 2007). A BR-ok virális, bakteriális és gomba patogénekkel szembeni védelmet biztosító hatásának molekuláris hátterét vizsgálva Nakashita és mtsai (2003) megállapították, hogy a dohányban és rizsben így előidézett ellenállóképesség a szalicilsav szignálúttól független, és nincs közvetlen kapcsolata a sebzésindukált, ill. szisztemikus szerzett rezisztenciával sem. Paradicsomban kimutatták, hogy a hőstresszel szembeni rezisztencia BR kezeléssel kiváltható növelése elsősorban egyes antioxidáns enzimek (szuperoxid-diszmutáz, aszkorbátperoxidáz, gvajakol-peroxidáz és kataláz) fokozott aktivitásával függ össze (Ogweno és mtsai, 2008).

6

Az eddigi ismeretek alapján jól látható, hogy a BR-ok szabályozó hatása minden fiziológiai funkció esetében más fitohormonok hatásával együtt, részben a jelátviteli utak kölcsönös befolyásolásán keresztül valósul meg. Elsősorban a teljes Arabidopsis lefedő génexpressziós eredményeként genomot analízisek figyelemreméltó átfedéseket lehetett kimutatni az auxin- és BR-reszponzív gének csoportjai között (Nakamura A és mtsai, 2003; Goda és mtsai, 2004a). Bár a növekedés-serkentő funkciókban a BR és gibberellin szabályozás egymásrautaltsága nyilvánvaló, e két hormoncsoport célgénjeinek transzkripciós kontrollja alapvetően egymástól függetlennek bizonyult (Yang GX és mtsai, 2004). Közös vonás volt ugyanakkor, hogy mind a BR-ok, mind a gibberellinek esetében jónéhány génnél ellentétes abszcizinsav-reguláltság volt tapasztalható (Vert és mtsai, 2005).

#### 2.1.4. BR érzékelés és jelátvitel

A szteroidok fontos hormonális szabályozó funkciót töltenek be a gombák, állatok és növények körében egyaránt. Bár maga a szabályozó rendszer a törzsfejlődés során nagyon korán kialakult, és egyes elemei strukturálisan igen konzerváltak, a növényvilágban az érzékelési és jelátviteli folyamatok lényegesen különböznek attól a korábban a többi eukariota szervezet alapján általánosnak vélt hatásmódtól, melyben a szteroid hormonok transzkripciós faktorként is működő sejtmagi receptorokhoz kötődve közvetlenül befolyásolják azok aktivitását (Belkhadir és Chory, 2006).

A BR szabályozás molekuláris hátterének felderítését nagyban segítette, hogy viszonylag könnyen izolálhatók voltak az érzékelés és jelátvitel elemeiben sérült mutánsok. Ez jórészt annak volt köszönhető, hogy *Arabidopsis*ban ezekért a funkciókért rendszerint egyetlen gén felelős. Az alig több mint egy évtizedre visszanyúló intenzív kutatások nyomán mára a fitohormonok között a BR-ok hatásmechanizmusa tekinthető az egyik legrészletesebben jellemzett jelátviteli rendszernek (Li JM és Jin, 2007; 2. ábra). Az *Arabidopsis*ban megismert, az alábbiakban részletezendő szignálátviteli folyamat legfontosabb elemeit kétszikű és egyszikű fajokban egyaránt sikerült azonosítani (Bishop, 2003).

A BR-ok érzékelését a sejtfelszín plazmamembránjában lokalizált BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) receptor biztosítja. Ez az ún. leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó receptor kinázok (LRRK) csoportjába tartozik, melynek



## 2. ábra: A BR szabályozás molekuláris mechanizmusa

A: BR hiányában a sejtmembránban lokalizált BRI1 receptor inaktív dimerként, a BKI1 kináz inhibitorral asszociált állapotban található. A BRI1-ről kiinduló gátlás hiányában a citoplazmában és a sejtmagban is jelenlevő BIN2 kináz foszforilálja a BR hatást közvetítő BES1 és BZR1 transzkripciós faktorokat, melyek foszforilált formái (P-BES1 és P-BZR1) a 26S proteoszómán keresztül degradálódnak. B: A hormon kötődése a BRI1 extracelluláris részéhez az intracelluláris kináz doménben konformáció-változást idéz elő, ami a BKI1 disszociációjához, és a receptornak a BAK1 koreceptorral, valamint a TTL és TRIP1 kináz szubsztrátokkal való összekapcsolódásához vezet. A létrejövő foszforilációs szignál a BIN2 kinázt inaktiválja egy ismeretlen (??), annak sejtmembránhoz kötődését előidéző mechanizmus útján. A BIN2 aktivitás hiányában a citoplazmában feldúsuló BES1 és BZR1 a sejtmagba transzportálódik, ahol a nukleáris lokalizációjú BSU1 foszfatáz által a foszforilált formáikból regenerált megfelelőikkel együtt a BR-regulált gének promótereihez kapcsolódva serkentik, vagy gátolják azok kifejeződését. A BES1 esetében feltételezik, hogy a BIM transzkripciós faktorral szinergisztikusan kapcsolódik E-box típusú kötőhelyekhez, míg a BZR1 talán egy még ismeretlen protein faktorral (?) kölcsönhatva kötődik a BRRE szekvenciákhoz. A vázlat Li JM és Jin (2007) összefoglaló ábrája alapján készült.

tagjai általában peptid természetű ligandumok érzékelésében játszanak szerepet. A BRI1 esetében a BR kötődését az extracelluláris receptor domén leucin-gazdag ismétlődései közé beékelt, kizárólag a BRI1-ben előforduló ún. sziget régió biztosítja (Li JM és Chory, 1997). A hormon kötődése elősegíti a BRI1-nek a szintén LRRK típusú BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) membránproteinnel való összekapcsolódását, ami transzfoszforilációs reakciókat követően a BRI1 intracelluláris kináz doménjének aktiválódását eredményezi (Li J és mtsai, 2002; Nam és Li JM, 2002). Az jelátvitel elindításához a BRI1 és BAK1 homodimerekből legalább tetramer, de esetleg még összetettebb struktúra kialakulása szükséges (Geldner és mtsai, 2007).

A hormon kötődését és a koreceptorral való oligomerizációt követően a BRI1 kináz doménje egy ma még kevéssé ismert foszforilációs szignált indít el. *In vitro* foszforilációs kísérletek alapján feltételezik, hogy a BRI1 közvetlen szubsztrátja egy transztiretrin-szerű (TTL) fehérje, vagy/és egy TGFβ-RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN 1 (TRIP1) homológ lehet (Nam és Li JM, 2004; Ehsan és mtsai, 2005). A foszforilációs lánc végül a BR szabályozás központi elemének tekintett BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2) kináz inaktiválásához vezet. A BIN2 az állatvilágból ismert GSK3/SHAGGY-típusú kinázok körébe sorolható (Choe és mtsai, 2002; Li JM és Nam, 2002). Aktív állapotában foszforilálja, és ezáltal destabilizálja a BR hatást a génexpresszió szintjén közvetítő BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) és BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1) transzkripciós faktorokat. A BR szignál a BIN2 kinázt inaktiválja, így a BZR1 és BES1 felhalmozódhat, és a sejtmagba jutva biztosítani tudja a hormonhatás megnyilvánulásához szükséges transzkripciós szabályozó hatást (Zhao és mtsai, 2002).

A szerkezetileg hasonló, de funkciójukban legalább részben ellentétes hatású BZR1 és BES1 egy önálló transzkripciós faktor családba tartoznak (Li L és Deng, 2005). Míg a BR-szabályozott promóterek CANNTG szekvencia-motívumaihoz kötődő BES1 főként pozitív regulátorként funkcionál (Yin és mtsai, 2005), a CGTG(T/C)G BRreszponz elemhez (BRRE) kapcsolódó BZR1 inkább a hormonhatás negatív szabályozója (He és mtsai, 2002 és 2005). E két transzkripciós elem működésének részletei még tisztázásra várnak. Nem világos például, hogy a szerkezetileg nagyon hasonló, aminosav-szekvenciájukban 88% homológiát mutató proteineket kötő DNS motívumok miként lehetnek ennyire különbözőek. A BES1 esetében leírták, hogy DNS kötését Myc-szerű bHLH transzkripciós faktorok (BIM) segítik (Yin és mtsai, 2005). Ennek alapján feltételezhető, hogy in vivo a BZR1 is valamilyen fehérjekomplex formájában funkcionál (Li JM és Jin, 2007). A citoplazmatikus és nukleáris lokalizáltságú BZR1 hatékonyságát BR-függő aktív magi transzportja is meghatározza (Ryu és mtsai, 2007), amiben fontos szerep jut a foszforilált BZR1-et regeneráló BSU1 foszfatáznak (Mora-Garcia és mtsai, 2004). Bár a BES1 sejtmagi import általi szabályozását nem vizsgálták, várható, hogy ennek esetében is hasonló kontroll mechanizmus működik.

## 2.1.5. BR-ok gyakorlati jelentősége

A BR-ok mezőgazdasági célú felhasználása növekedés-serkentő és széles spektrumú sztressz-protektív hatásuk miatt is ígéretesnek tűnt. Laboratóriumi kísérletekben számos haszonnövény mutatott kedvezőbb növekedési, terméskötési és rezisztencia tulajdonságokat felszíni BR kezelés hatására (Mandava, 1988). Bár az Egyesült Államokban, Kanadában, Japánban és Kínában komoly erőfeszítéseket tettek a mezőgazdasági felhasználhatóság körülményeinek megteremtésére, ennek mindmáig legkomolyabb akadálya a bioaktív BR formák viszonylag rövid életideje az alkalmazás körülményei között. Ennek a technikai akadálynak a leküzdésére olyan BL alapvázú szintetikus származékokat fejlesztettek ki, amelyek nagyobb stabilitását a szteroid A gyűrű és az oldallánc (1. ábra) hidroxilált pozícióinak acilációs, vagy epoxidációs védelmével biztosították (Kamuro és Takatsuto, 1999). Ilyen BR formák szabadföldi kipróbálása Japánban, Kínában és a Belorusz Köztársaságban folyik (Khripach és mtsai, 2003).

A felszíni alkalmazásnál hatékonyabbak lehetnek azok a transzgenikus eljárások, amelyekkel a haszonnövények endogén BR tartalma, vagy a hormonnal szembeni érzékenysége változtatható meg, lehetőség szerint szerv-, szövet-, vagy stádium-specifikus módon. Az ilyen eljárások alkalmazhatóságát Arabidopsisban egyértelműen igazolni lehetett (Choe és mtsai, 2001; Savaldi-Goldstein és mtsai, 2007), de a transzgenikus növényekkel kapcsolatos szabályozások miatt biotechnológiai hasznosításuk kilátásai bizonytalanok. Életképes megközelítést kínálhat viszont az a célzott lokális genomi léziók létrehozásán alapuló mutánsizolálási eljárás (TILLING), amelynek segítségével ismert funkciójú gének hatékonyan inaktiválhatók. Már csak azért is, mert a gibberellinekhez hasonlóan, ahol az ún. zöld forradalomhoz vezető nagy hozamú és ellenálló gabonafajták csökkent hormonhatást eredményező mutánsoknak bizonyultak (Peng és mtsai, 1999; Silverstone és Sun, 2000), jelenleg a BR-ok esetében is a hormonhiányos, ill. inszenzitív mutánsok hasznosíthatósága látszik nyilvánvalóbbnak. Bár Arabidopsisban fokozott BR bioszintézis mellett fokozott vegetatív növekedést és nagyobb maghozamot is megfigyeltek (Choe és mtsai, 2001), gazdasági vonatkozásában ennél meggyőzőbbnek ígérkezik, hogy több nagy ellenállóképességű termesztett fajtáról derült ki, hogy BR-deficienciát, vagy -inszenzitivitást okozó természetes mutációt hordoz (Bishop és mtsai, 1996; Fukuta és mtsai, 2004; Saisho és mtsai, 2004). Például egy fontos BR-bioszintetikus gén inaktiválásával létrehozott hormonhiányos rizs mutáns felálló rövidebb levelei miatt a termesztésben a kiindulási fajtánál lényegesen ellenállóbbnak és nagyobb hozamúnak bizonyult, jelezve, hogy BR mutánsok is csatlakozhatnak a zöld forradalomhoz (Sakamoto és mtsai, 2006).

## 2.2. A BR-ok bioszintézise

A növényekben előforduló számos BR forma megismerése jó alapot biztosított az ezek szintéziséért felelős anyagcsereutak felderítésének megkezdéséhez. Kezdetben ezen vizsgálatok során a bioszintézis feltételezett intermediereinek szintetikus, deutériummal jelölt formáinak *in vivo* átalakulásait követték a konverziós termékek gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízisével. E munka során kísérleti objektumként elsősorban a viszonylag magas endogén BRszinttel rendelkező *Catharanthus roseus* sejtszuszpenziós kultúráit használták. A konverziós kísérletek révén ismertté váltak a bioszintézis legfontosabb intermedierei, és nagy vonalakban a kialakításukért felelős biokémiai lépések sorrendje is. Ahhoz viszont, hogy a bioszintézisben résztvevő enzimek, és ezek szabályozása is ismertté válhasson, szükség volt az egyes átalakulási lépésekben sérült BR-deficiens mutánsok azonosítására (Altmann, 1999).

#### 2.2.1. A bioszintézisút lépései

A BR-ok bioszintézise a növények sejtmembránjaiban nagy mennyiségben előforduló fitoszterolokból kiindulva számos, főként oxidatív lépésen át jut el a végtermék BL-ig. A *Catharanthus* kultúrákon és más kétszikű csíranövényeken izotóppal jelölt szubsztrátokkal végzett konverziós kísérletek eredményeként meghatározhatóak voltak a C<sub>28</sub> vázú kampeszteroltól induló fő szintézisút legfontosabb intermedierei (Suzuki H és mtsai, 1994 és 1995). A metabolikus termékek további vizsgálata alapján Choi és mtsai (1997) arra a következtetésre jutottak, hogy a BR bioszintézis folyamata a kezdeti lépéseket követően két párhuzamosan haladó ágra válik szét, amelyek csak a végső oxidációs reakcióknál egyesülnek újra. A korai és késői C-6 oxidációs utaknak elnevezett reakcióláncokra épülő modellnek meghatározó szerepe volt a BR bioszintézisről alkotott elméletek kialakításában, annak ellenére, hogy a korai oxidációs reakció minden növényben alárendelt jelentőségű, és egyes növényfajokban ennek termékei nem is mutathatók ki (Nomura és mtsai, 2001). A

később megismert korai C-22 hidroxilációs mellékúttal (Fujioka és mtsai, 2002) kiegészített anyagcsere séma (3. ábra) a legutóbbi időkig BR bioszintézis általánosan elfogadott modelljének volt tekinthető (Fujioka és Yokota, 2003; Bishop, 2007)



ábra: A BR bioszintézis metabolit-konverziós adatokból levezetett reakcióútjai A vázlat az élettani szempontból legfontosabb C28 típusú BR-ok szintézisének lépéseit mutatja be a membránalkotó kampeszteroltól (CR) a végtermék brasszinolidig (BL) Suzuki H és mtsai (1994 és 1995); Choi és mtsai (1997), valamint Fujioka és mtsai (2002) munkái alapján. A sémán szereplő intermedierek: 22-hidroxikampeszterol (22-OHCR), ergoszt-4-en-3-on (4-en-3-on), 22-hidroxiergoszt-4-en-3-on (22-OH-4-en-3on), ergoszt-3-on (3-on), 22-hidroxiergoszt-3-on (22-OH-3-on), kampesztanol (CN), 6oxokampesztanol (6-oxoCN), 6-dezoxokataszteron (6dCT), kataszteron (CT), 6dezoxoteaszteron (6dTE), teaszteron (TE), 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron (6dDT), 3dehidroteaszteron (DT), 6-dezoxotifaszterol (6dTY), tifaszterol (TY), 6dezoxokasztaszteron (6dCS), kasztaszteron (CS).

Az intermedier-konverziós vizsgálatok alapján tisztázódott, hogy magasabbrendű növényekben a szteroid hormon alapvetően egységes metabolikus folyamatok révén termelődik (Nomura és mtsai, 2001). A BR szintézis intermediereinek, továbbá ezek képződési sorrendjének megismerése jelentősen hozzájárult a molekuláris genetika módszereivel azonosított bioszintetikus gének, ill. termékeik funkcióinak pontos meghatározásához. Az ennek eredményeként megismert enzimológiai tulajdonságok révén pedig sokkal pontosabb képet lehetett alkotni a BR bioszintézis lehetséges útjairól, valamint ezek egymáshoz viszonyított élettani jelentőségéről (Bishop, 2007).

#### 2.2.2. A BR bioszintézis enzimei

A BR bioszintézis enzimeinek azonosítása jórészt azoknak a hatékony genetikai módszereknek volt köszönhető, melyek lehetővé tették BR-hiányos mutánsok izolálását és karakterizálását. Az Arabidopsis modellnövényben létrehozott mutánsgyűjtemények vizsgálata során hamar az érdeklődés középpontjába kerültek a törpe fenotípust eredményező mutációk, melyek gyakran bizonyultak defektívnek a növekedést serkentő hormonok (pl. gibberellinek) szintézisében (Feldmann, 1991). A külső BR kezeléssel menekíthető fenotípusú törpe vonalak közül kerültek ki az elsőként jellemzett BR hiánymutánsok (Li JM és mtsai, 1996; saját munkánk), melyeket rövidesen továbbiak megismerése követett. A teljes Arabidopsis genom szekvenciájának meghatározását követően lehetőség nyílt a bioszintézis már ismert résztvevőiével közeli rokon gének azonosítására, és ezek többsége esetében a BR szintézisben játszott szerepük kimutatására (Shimada és mtsai, 2001; Kim GT és mtsai, 2005). Mára az Arabidopsis BR-bioszintetikus génjeinek túlnyomó része ismertté vált. Ezek a szteroid-5α-reduktáz funkciójú DE-ETIOLATED 2 (DET2) génjétől (Li JM és mtsai, 1996) eltekintve valamennyien citokróm P450 monooxigenázokat kódolnak. Bár a bioszintetikus enzimek génjei közül sokat több növényfajban is azonosítottak (1. táblázat), ezek közül az alábbiakban főként az Arabidopsisban előforduló, a jelen disszeráció anyagához közvetlenül kapcsolódó képviselőiket (4. ábra) szeretném röviden ismertetni.

gén	kódolt enzim funkciója	növényfaj	hivatkozás
DET2	5α-reduktáz	Arabidopsis thaliana	Li JM és mtsai, 1996 Noguchi és mtsai, 1999b
LK	5α-reduktáz	Pisum sativum	Nomura és mtsai, 2004
SIDET2	5α-reduktáz	Solanum lycopersicum	Rosati és mtsai, 2005
GhDET2	5α-reduktáz	Gossipium hirsutum	Luo és mtsai, 2007
PnDET2	5α-reduktáz	Pharbitis nil	Suzuki Y és mtsai, 2003
SAX1	? C-3 oxidáz	Arabidopsis thaliana	Ephritikhine és mtsai, 1999
CYP85A1	C-6 oxidáz	Arabidopsis thaliana	Shimada és mtsai, 2001
Dwarf/CYP85A1	C-6 oxidáz	Solanum lycopersicum	Bishop és mtsai, 1999
Brd1/CYP85A1	C-6 oxidáz	Oryza sativa	Hong és mtsai, 2002 Mori és mtsai, 2002
CYP85A1	C-6 oxidáz	Pisum sativum	Jager és mtsai, 2007
CYP85A2	C-6 oxidáz,	Arabidopsis thaliana	Shimada és mtsai, 2003
	BL-szintáz		Nomura és mtsai, 2005
CYP85A3	C-6 oxidáz, BL-szintáz	Solanum lycopersicum	Nomura és mtsai, 2005
CYP85A6	C-6 oxidáz	Pisum sativum	Jager és mtsai, 2007
CPD/CYP90A1	? C-23 hidroxiláz	Arabidopsis thaliana	saját adataink
	C-3 oxidáz		Ohnishi és mtsai, 2007
Dpy/? CYP90A1	? C-23 hidroxiláz	Solanum lycopersicum	Koka és mtsai, 2000
Cos10/?CYP90A1	? C-23 hidroxiláz	Vigna radiata	Yang MT és mtsai, 2005
OsCPD1/CYP90A3	? C-23 hidroxiláz	Oryza sativa	Sakamoto és Matsuoka, 2006
OsCPD2/CYP90A4	? C-23 hidroxiláz	Oryza sativa	Sakamoto és Matsuoka, 2006
DWF4/CYP90B1	C-22 hidroxiláz	Arabidopsis thaliana	Choe és mtsai, 1998
OsDwf4/CYP90B1	C-22 hidroxiláz	Oryza sativa	Sakamoto és mtsai, 2006
ZmDwf4/CYP90B1	C-22 hidroxiláz	Zea mays	Liu és mtsai, 2007
CYP90B3	C-22 hidroxiláz	Solanum lycopersicum	Ohnishi és mtsai, 2006a
ROT3/CYP90C1	C-23 hidroxiláz	Arabidopsis thaliana	saját adataink
CYP90D1	C-23 hidroxiláz	Arabidopsis thaliana	saját adataink
D2/CYP90D2	? C-3 oxidáz	Oryza sativa	Hong és mtsai, 2003
CYP90D3	? C-3 oxidáz	Oryza sativa	Hong és mtsai, 2003
DDWF1/CYP92A6	? C-2 hidroxiláz	Pisum sativum	Kang és mtsai, 2001
D11/CYP724B1	C-22 hidroxiláz	Oryza sativa	Sakamoto és mtsai, 2006
CYP724B2	C-22 hidroxiláz	Solanum lycopersicum	Ohnishi és mtsai, 2006a

# 1. táblázat: Azonosított BR-bioszintetikus gének

### 2.2.2.1. Citokróm P450 monooxigenázok

A citokróm P450 monooxigenázok (röviden: P450-ek) igen ősi típusú hem proteinek, amelyek valamennyi prokariota és eukariota szervezetben előfordulnak, és jellemzően főként hidrofób karakterű szubsztrátok oxidatív szubsztitúciós reakcióit katalizálják molekuláris oxigén felhasználásával. Az enzimcsoport elnevezése tagjainak a hem redukált állapotában mérhető jellegzetes, 450 nm-es abszorpciós maximumából ered. Az eukariota (de nem organelláris) P450-ek a sejtek endoplazmatikus retikulumában lokalizált membránproteinek. Enzimatikus reakciójukat követően oxidatív regenerációjukat a velük strukturális komplexet képező NADPHfüggő P450 reduktázok biztosítják (Nebert és mtsai, 1991). Mivel a P450-ek egy része igen széles szubsztrát-spektrummal rendelkezik, csoportosításuk alapjául a szokásos enzimkatalógus (EC) besorolás helyett az egyes enzimeket aminosav-szekvenciájuk alapján, a 40%-nál nagyobb azonosságot mutató tagokból álló, sorszámozott CYP családokba osztották be. A növényvilágban különösen nagy formagazdagságban előforduló P450-ek közül az Arabidopsis genomban 47 család tagjait kódoló több mint 270 gént azonosítottak (Nelson és mtsai, 2004; Schuler és mtsai, 2006). Ezek jórészt másodlagos anyagcsere-folyamatokban vesznek részt, alapvető szerepet betöltve például a fenilpropanoid anyagcserében. Emellett fontos feladatuk van az alkaloidok, terpének és egyes fitohormonok (gibberellinek, BR-ok, auxinok és jazmonsav) bioszintézisében is (Chapple, 1998).

A citokróm P450-ek nomenklatúrája szerint a CYP előtag után a családot azonosító számot, majd az alcsaládot definiáló betűjelet követő szám egy konkrét P450, vagy az azt kódoló gén megjelölésére szolgál (Nebert és mtsai, 1991). A BR bioszintézissel kapcsolatos szakirodalomban ez a konvenció nem mindig érvényesült következetesen, és az elnevezések végén álló számokat a konkrét P450 azonosítása helyett gyakran egy már jellemzett enzimmel fennálló hasonlóság jelzésére használták. Ennek következtében fordulhat elő például, hogy az eredeti közlemény (Shimada és mtsai, 2001) alapján a CYP85A1 nevet az elsőként leírt paradicsom Dwarf (Bishop és mtsai, 1996) mellett egy később ugyanígy elnevezett *Arabidopsis* enzimre is használják.

Az alább ismertetendő, a BR bioszintézisben meghatározó szerepű és általánosan előforduló P450 típusú enzimek valamennyien az egymással közeli rokonságot mutató CYP90 és CYP85 családokba tartoznak. Ezekkel ellentétben a csak egy-egy növényfajból ismert CYP92, CYP724 és CYP734 típusú enzimeknek a BR bioszintézisben játszott szerepe vagy marginális, vagy nem kellően alátámasztott (Nomura és Bishop, 2006).



4. ábra: Az Arabidopsis BR-bioszintetikus enzimei által katalizált reakciók A szintézis egyes konverziós lépéseit katalizáló, vastagbetűs szimbólumokkal jelölt enzimek Fujioka és Yokota, 2003; Ohnishi és mtsai, 2007, valamint saját munkánk alapján. A még azonosítatlan enzimeket, vagy nem egyértelmű katalitikus funkciókat kérdőjelek jelzik. Az egyes BR formák rövidített nevei azonosak a 3. ábrán szereplőkkel.

## CPD/CYP90A1

A CPD (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM) enzimológiai elnevezéssel CYP90A1 - génjét a T-DNS inszercióval létrehozott *cpd* mutáns segítségével lehetett azonosítani (saját adataink). A BR-hiányos, törpe habitusú és konstitutív fotomorfogenikus tulajdonságokat mutató *cpd* fenotípusa BR kezeléssel a vad típuséhoz hasonlóvá állítható helyre. A BR bioszintézis intermediereivel végzett menekítési kísérletek a CPD-nek a szteroid oldallánc C-23-as helyzetű hidroxilációjában betöltött szerepére utaltak, de újabb *in vitro* vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy közvetlenül a C-3 helyzetű hidroxil ketocsoporttá való oxidációját katalizálja (saját adataink; Ohnishi és mtsai, 2007).

#### DWF4/CYP90B1

A *dwf4* (*dwarf 4*) szintén T-DNS inszercióval létrehozott BR-hiányos mutáns, amely a *cpd*-hez rendkívül hasonló fenotipikus jegyeket mutat (Azpiroz és mtsai, 1998). Az inszerció segítségével azonosított *DWF4* gén a CPD/CYP90A1-gyel nagyfokú aminosav-sorrend egyezést mutató CYP90B1 enzimet kódolja. BR intermedierekkel végzett fenotípus menekítési kísérletek és *in vivo* metabolit-konverziós adatok alapján ismert, hogy ez a P450 a szteroid oldallánc C-22 helyzetű hidroxilációját végzi (Choe és mtsai, 1998; Fujioka és mtsai, 2002). *In vitro* enzimológiai vizsgálatok alapján a DWF4 lehetséges szubszrtátjai közül (4. ábra) a kampeszterol 22-hidroxilációját preferáltan katalizálja, ami a korai C-22-hdroxilációs anyagcsereút (3. ábra) kiemelt szerepére utal (Fujita és mtsai, 2006).

#### ROT3/CYP90C1 és CYP90D1

A CYP90A1 és CYP90B1 hiánymutánsaival ellentétben ezen két enzim valamelyikére nézve deficiens vonalak nem fordultak elő a nagy számban izolált Arabidopsis törpe mutánsok között (Feldmann, 1991). A CYP90C1 génben sérült rotundifolia 3 (rot3) mutáns igen enyhe levél fenotípust mutat, amit eredetileg csak a levélsejtek hosszanti megnyúlásának zavarával hoztak összefüggésbe (Kim GT és mtsai, 1998). A ROT3/CYP90C1 és CYP90D1 esetleges szerepe a BR bioszintézisben a CYP90 családba való tartozásuk alapján vetődött fel, majd ezt megerősítették azok az adatok, melyek szerint a BL mint végtermék valamennyi CYP90 gén kifejeződését azonos módon gátolja (saját adataink). A rot3 és cyp90d1 vonalak vizsgálata során kiderült, hogy bár ezek külön-külön igen gyenge fenotípusúak, a cyp90c1cyp90d1 dupla mutáció BR-deficiens törpe növényeket eredményezett (Kim GT és mtsai, 2005). Bár a genetikai adatok azonos funkciójú gének mutációjára utaltak, a mutáns vonalak BR tartalmának analízise alapján a CYP90C1-et C-2 hidroxilázként, a CYP90D1-et pedig egy ennél korábbi, feltételezetten C-3 izomerizációs reakciót katalizáló enzimként azonosították (Kim GT és mtsai, 2005). Heterológ rendszerben kifejeztetett CYP90C1 és CYP90D1 enzimológiai vizsgálatával később tisztázni lehetett, hogy ezek valójában redundáns szerepű, a szteroid oldallánc C-23 pozíciójának hidroxilációját végző P450-ek (saját adataink).

#### CYP85A1 és CYP85A

Arabidopsisban a BR bioszintézis mutánsait általában a nagy számban izolált törpe vonalak köréből azonosították. A *CYP85A1* és *CYP85A2* géneket érintő ilyen mutánsok ugyanakkor nem álltak rendelkezésre, ezért ezeket a paradicsom *Dwarf/CYP85A1* génnel (Bishop és mtsai, 1996) mutatott szekvencia homológia alapján ismerték fel. A paradicsom CYP85A1 szerepének *in vivo* (Bishop és mtsai, 1996) és *in vitro* (Bishop és mtsai, 1999) vizsgálata tisztázta, hogy az enzim a már biológiailag aktív kasztaszteront létrehozó C-6 oxidációs lépést katalizálja. Az *Arabidopsis CYP85* génjei által kódolt, egymással 82%-os aminosav-szekvencia egyezést mutató P450-ek alapvetően redundáns funkciójára utalt, hogy a jellegzetes BR-hiányos törpe fenotípust csak a *cyp85a1cyp85a2* kettős mutáns mutatta, míg az egyszeres mutánsok nem, vagy alig voltak megkülönböztethetők a vad típusú növényektől (Kwon és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005).

A C-6 oxidázok részletesebb funkcionális vizsgálata feltárta, hogy a nagyfokú aminosav-sorrend azonosság ellenére a két *Arabidopsis* enzim szerepe részben különböző. Míg a CYP85A1 reakciójának a kasztaszteron a végterméke, addig a CYP85A2 ezen túl BL-szintáz aktivitással is rendelkezik, amely egy Baeyer-Villigertípusú laktamizációs reakcióval kasztaszteronból BL-ot tud létrehozni (Kim GT és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005). Ezzel egyidejűleg vált ismertté a C-6 oxidázok hasonló funkcionális diverzifikációja paradicsomban is, ahol a CYP85A1 a vegetatív szervek kasztaszteron szintézisét végzi, míg a termésspecifikus, BL-szintáz aktivitással is rendelkező CYP85A3 a csak a bogyóban előforduló BL képződéséért felelős (Nomura és mtsai, 2005).

#### 2.2.2.2. A BR bioszintézis enzimeinek katalitikus tulajdonságai

A CYP85 és CYP90 családokba tartozó egyes, heterológ rendszerben kifejeztetett enzimek biokémiai vizsgálata (Bishop és mtsai, 1999; Shimada és mtsai, 2001; Fujita és mtsai, 2006; Ohnishi és mtsai, 2006a és 2007), valamint elsősorban az *Arabidopsis* és paradicsom endogén BR intermediereinek analízise (Bishop és mtsai, 1999; Fujioka és mtsai, 2002) azt mutatta, hogy ezen P450-ek rendszerint többféle, szerkezetileg hasonló molekulát is elfogadnak szubsztrátként. Ennek alapján

nyilvánvalóvá vált, hogy a növényben a biológiailag aktív BR-ok nem egyetlen úton, hanem hálózatszerű reakciók sorozatának eredményeként jönnek létre. Néhány enzimnél pontosan meghatározták a lehetséges szubsztrátok affinitási értékeit, és ezek esetenként nagy, akár két nagyságrendnyi különbséget is mutattak (Fujita és mtsai, 2006; saját adataink; Ohnishi és mtsai, 2007). A megismert konverziós sebességi adatok alapján valószínűsíthető a BR bioszintézisnek az a leghatékonyabb útja, amely optimális enzim- és szubszrátellátottság mellett meghatározó lehet a növények sejtjeiben. Ugyanakkor ismert, hogy mind a bioszintézis génjeinek kifejeződése, mind a BR intermedierek spektruma összetett egyedfejlődési és szervspecifikus szabályozás alatt áll (Fujioka és Yokota, 2003), ami az egyes reakcióutak fontosságának lényeges átrendeződését eredményezheti. Feltételezhető tehát, hogy ezen tényezők függvényében a CYP85 és CYP90 enzimek relaxált szubsztrát-specificitása fontos szerepet játszhat a BR szintézis hatékonyságának pontos beállításában.

#### 2.2.2.3. A bioszintézis sebesség-meghatározó lépései

A fiziológiás hormonszint homeosztázisának fenntartásában fontos szerepe van a bioszintetikus és inaktivációs folyamatok összehangolt szabályozásának. A bioszintézis hatékonyságát a sebesség-meghatározó lépéseket katalizáló enzimek kontrollálják. Ezen enzimek azonosítása céljából Nomura és mtsai (2001) részletesen összehasonlították az egyes BR intermedierek felhalmozódását Arabidopsisban, borsóban és paradicsomban. Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy ezekben a növényfajokban a CYP90A, CYP90B és CYP85A alcsaládokba tartozó enzimek szubsztrátjai а többi intermedier mennyiségéhez viszonyítva jelentősen felhalmozódnak. Ez azt mutatja, hogy az ilyen típusú enzimek: C-23 és C-22 hiroxilázok, valamint C-6 oxidázok kifejeződése és aktuális aktivitása meghatározó lehet a BR bioszintézis lokális szabályozásában (Nomura és mtsai, 2001). Bár minden esetben csupán egy sebesség-meghatározó reakció áteresztőképességétől függ a szintézis hatékonysága, az anyagcsereút hálózatos voltából és a bioszintetikus gének differenciált expressziójából adódóan az egyes szervekben vagy fejlődési szakaszokban az említett három enzim bármelyike által katalizált konverziós lépés limitálóvá válhat. A BR intermedier poolok összehasonlítása fontos adatokkal szolgált az anyagcsereút szabályozásának megismeréséhez, és megmutatta, hogy ezek a regulációs folyamatok igen hasonlóak mindhárom vizsgált kétszikű faj esetében (Nomura és mtsai, 2001).

## 2.3. Az endogén BR-szint regulációja

A környezeti hatások nagymértékben befolyásolják a növények életfolyamatait. A környezeti ingerek érzékelése az egyes sejtekben lezajló folyamat, ugyanakkor élettani szempontból igen fontos a válaszreakcióknak a szövetek és szervek szintjén történő összehangolása, amelyben a fitohormonoknak van kulcsfontosságú szerepe. A hormonválasz kialakulásában fontos tényező egy adott hormon lokális koncentrációja, mely az aktuális hormonérzékenységgel együtt a biológiai válasz mértékének meghatározója. Egy adott helyen és időben a hormon felhalmozódása függ a *de novo* hormonszintézistől, a jelenlevő hormon reverzibilis vagy végleges inaktivációjától, valamint a szervezetben lejátszódó transzportfolyamatoktól.

#### 2.3.1. Transzport és inaktiváció

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy a BR-ok transzportja a növényen belül elhanyagolható. Erre utal, hogy a paradicsom transzpozonos mutagenezisével létrehozott *dwarf* mutáns levelének revertáns mozaikfoltjai nem befolyásolják a BRdeficiens szegmensek zsugorodott fenotípusát (Bishop és mtsai, 1996), és hogy borsón és paradicsomon végzett oltási kísérletekben a vad típusú rész sem alanyként, sem oltóvesszőként nem képes a hormonhiányos rész fenotípusának helyreállítására (Symons és Reid, 2004; saját adataink). Az *Arabidopsis cpd* mutánsának szövetspecifikus komplementálhatósága azt mutatja, hogy a BR-ok diffúziója a levél különböző típusú sejtrétegei között is igen korlátozott (Savaldi-Goldstein és mtsai, 2007). Ezen eredmények alapján a BR-ok hatása a szintézisük helyéhez közel, autokrin/parakrin módon érvényesül.

Az utóbbi évek során *Arabidopsis*ban több olyan enzimet is azonosítottak, melyek a bioaktív BR-ok inaktiválásáért felelősek. Ezen reakciók egy részét a BRbioszintetikus génekkel közelebbi rokonságot nem mutató citokróm P450-ek végzik. A *PHYB4 ACTIVATION-TAGGED SUPRESSOR 1 (BAS1*) gén által kódolt CYP734A1 (korábban CYP72B1; Turk és mtsai, 2003) és a *CHIBI 2 (CHI2*) által kódolt CYP72C1 (Nakamura M és mtsai, 2005) rendkívül alacsony szinten expresszálódik. Kifejeződésük magas BL-szint mellett, vagy erős fény hatására indukálható, de a kiváltó inger megszűnését követően gyorsan visszaáll az alapszintre. Ez azt jelzi, hogy e két enzimnek fontos szerepe van a hormon homeosztázis fenntartásában (Turk és mtsai, 2003 és 2005). A CYP72C1 által katalizált reakció jelenleg még tisztázatlan, de a CYP734A1 esetében ismert, hogy a bioaktív BR-ok (BL és kasztaszteron) irreverzibilis inaktivációját okozó C-26 helyzetű hidroxilációt katalizálja (Turk és mtsai, 2005). Ugyanezt az inaktivációs reakciót lehetett kimutatni a paradicsom azonos P450 családba tartozó CYP734A7 enzimének esetében is (Ohnishi és mtsai, 2006b).

A biológiailag aktív BR formák inaktiválásában résztvevő enzimek mellett repcéből és *Arabidopsis*ból olyan szulfotranszferáz és glikoziltranszferáz enzimeket is leírtak, amelyek *in vitro* reakcióban a BR bioszintézis számos intermedierét képesek szulfonálni, ill. glikozilálni (Rouleau és mtsai, 1999; Poppenberger és mtsai, 2005). Bár ezeknek a reakcióknak az élettani szerepe ismeretlen, a glikozilációról feltételezik, hogy egyes prekurzorok reverzibilis konjugációjával kivonja azokat a bioszintézisből. A konjugált formák mennyiségi vizsgálatai arra utalnak, hogy a reverzibilis inaktivációs folyamatok a korai BR intermediereket és az aktív származékokat egyaránt érinthetik (összefoglalásul: Szekeres és Bishop, 2006). Jelenlegi ismereteink szerint a BR inaktivációért felelős enzimek feladata elsősorban a hormon homeosztázis biztosítása. Ez történhet a fölösleges aktív formák irreverzibilis átalakításával és ezt követő lebontásával (Adam és mtsai, 1996; Turk és mtsai, 2005), vagy - elsősorban a BR felhalmozást igénylő reproduktív képletekben - a bioszintetikus intermedierek/termékek átmeneti konjugációjával (Asakawa és mtsai, 1996; Nomura és mtsai, 2007).

A rendelkezésre álló adatok alapján az aktív BR formák inaktivációjában résztvevő enzimek fiziológiás körülmények között csak rendkívül alacsony szinten fejeződnek ki, és a szteroid hormon növényen belüli eloszlását érdemben transzport folyamatok sem befolyásolják. Mindez arra utal, hogy BR-ok lokális felhalmozódásában a *de novo* bioszintézisnek meghatározó szerepe van.

#### 2.3.2. A bioszintézis génjeinek transzkripciós szabályozása

A BR bioszintézis hatékonysága jelentős mértékben függ a sebességmeghatározó reakció(ka)t katalizáló enzim(ek) mennyiségétől. Ezek kifejeződése összetett transzkripciós szabályozás alatt áll, ami arra utal, hogy termelődésük alapvetően ezen a szinten regulált. Míg a fejlődési stádiumoktól függő és szervspecifikus kontroll az egyes bioszintetikus gének esetében differenciáltan működik, a hormon homeosztázist biztosító szabályozás a P450 gének aktivitását összehangoltan, egységes mechanizmus révén határozza meg (Fujioka és Yokota, 2003).

## 2.3.2.1. Végtermékgátlás

A BR bioszintézisben résztvevő gének közül először a *CPD*-ről mutatták ki, hogy kifejeződését a szintézisút végtermékének tekintett BL koncentráció-függő módon gátolja. További vizsgálatok kiderítették, hogy *Arabidopsis*ban a BR szintézis valamennyi P450 génjének expressziója hasonló végtermékgátlás révén kontrollált (saját adataink; Tanaka és mtsai, 2005). Annak alapján, hogy ezeknek a géneknek a BR-függő aktivitása igen széles, 15-20-szoros különbségeket mutató skálán mozog, de az egyedfejlődés folyamán valamilyen mértékben végig részlegesen represszált állapotban marad, ez a visszacsatolásos szabályozó mechanizmus a bioszintézis fontos fiziológiás regulátorának tekinthető. Ez a stringensen működő negatív visszacsatolásos rendszer a BR bioszintézis gének kifejeződésének erőssége és az aktív BR-ok szintje közti szoros kapcsolatot bizonyítja. A bioszintetikus funkciók transzkripciós szintű végtermékgátlása más növényi hormoncsaládok esetében is ismert, és különösen részletesen tanulmányozott a gibberellin szintézis utolsó két reakcióját katalizáló enzimek génjeinek esetében (Yamaguchi és Kamiya, 2000).

He és mtsai (2002 és 2005) kimutatták, hogy a BR bioszintézis génjeinek BLfüggő represszióját a BZR1 transzkripciós faktor biztosítja. Ez a protein számos BRregulált gén kifejeződését befolyásolja, és feltételezhetően kölcsönható partnereinek természetétől függően mind pozitív, mind negatív szabályozó komplexek kialakításában részt vehet (He és mtsai, 2002). A BZR1 közvetlenül kapcsolódik a valamennyi BR bioszintézis gén promóterében megtalálható hat nukleotidányi BRRE elemhez, ami erős repressziós hatást eredményez (He és mtsai, 2005).

#### 2.3.2.2. Fejlődési stádiumtól függő szabályozás

A BR-bioszintetikus gének expressziós vizsgálatai azt is feltárták, hogy ezek jellegzetes, fejlődési stádiumtól függő kifejeződési mintázatot mutatnak. Ez összhangban van azzal, hogy a BR-oknak fontos szerepük van az egyes fejlődési szakaszok elindításában, illetve szabályozásában. *Arabidopsis*ban valamennyi BR-bioszintetikus P450 gén nagymértékben indukálódik a csírázás első hetében, majd kifejeződésük szintje a második hét végére egy viszonylag stabil, a korábbi maximum 10%-a alatti értéken stabilizálódik (saját adataink). A korai csíranövény szakaszban - a végtermékgátláshoz hasonlóan - valamennyi *CYP85* és *CYP90* gén nagyjából azonos

módon szabályozódik. Az *Arabidopsis*on, paradicsomon, szőlőn, borsón és uborkán (*Cucumis sativa*) végzett vizsgálatok szerint viszont sokkal differenciáltabbak azok a szervspecificitást is tükröző aktiválódási mintázatok, amelyek felnőtt növényekben a reproduktív szervek kialakulását kísérik (saját adataink; Nomura és mtsai, 2005; Symons és mtsai, 2006; Nomura és mtsai, 2007; Fu és mtsai, 2008).

#### 2.3.2.3. Szervspecifikus reguláció

Az összehangoltan érvényesülő végtermékgátlásos és korai fejlődési szabályozással ellentétben az egyes BR bioszintézis gének jellegzetes szervspecifikus kifejeződési mintázatot mutatnak. Arabidopsisban a potenciális sebesség-meghatározó lépéseket katalizáló enzimek génjei (CPD, DWF4 és CYP85A2) már csíranövény korban elsősorban a hajtáscsúcsban és a differenciálódó levélkezdeményekben expresszálódnak, míg a CYP85A1, CYP90C1 és CYP90D1 transzkriptumok szintje a gyökérben a legmagasabb (saját adataink; Shimada és mtsai, 2003; Kim HB és mtsai, 2006). A génaktivitások szervspecificitásának feltehetően fontos szerepe van a lokális BR-szintek beállításában, koncentráció-grádiensek kialakulásában, és ezáltal - más fitohormonok hatásával összhangban - differenciációs folyamatok elindításában. Paradicsomban a reproduktív szervek kialakulása során a bioaktív kasztaszteron szintéziséhez szükséges DWARF/CYP85A1 gén erős átmeneti aktiválódást mutat (saját adatunk), és a más szervekben nem megnyilvánuló CYP85A3 is magas szinten kifejeződik (Nomura és mtsai, 2005). Hasonlóan szembetűnő átmeneti indukciót figyeltek meg a szőlő CYP85 esetében is a bogyóérés során (Symons és mtsai, 2006), valamint több BR-bioszintetikus gén működésében a borsó és uborka terméseinek fejlődése folyamán (Nomura és mtsai, 2007; Fu és mtsai, 2008).

## 2.4. Az élettani funkciók hormonális szabályozása

## 2.4.1. Regulációs folyamatok az egyedfejlődés szintjén

Jelenlegi ismereteink alapján a BR-oknak kiemelt jelentősége van az egyedfejlődés korai szakaszában, valamint a reproduktív szervek kialakításának a stádiumában. A magvak magas hormontartalma, illetve a csírázás során történő intenzív *de novo* szintézisek fedezik a normális fotomorfogenezishez, levélképződéshez szükséges hormonmennyiséget. *Arabidopsis*ban az egyedfejlődés második hetétől jelentős mértékben csökken a BR bioszintézis génjeinek a kifejeződése, és ezzel párhuzamosan a hormontartalom is (saját adataink). A BR szintézisben résztvevő (elsősorban CYP85) gének erős indukcióját, valamint ezzel párhuzamosan a bioaktív hormon felhalmozódását dokumentálták a reproduktív szervek kialakulása során is (saját adataink; Nomura és mtsai, 2005 és 2007; Symons 2006). Bár valószínűleg а nővények és mtsai. életciklusa során а hormonérzékenységben is változások következnek be, erre vonatkozó adatok egyelőre nem állnak rendelkezésre.

## 2.4.2. Napszakos szabályozás

Helyhez kötött életmódjuk miatt a magasabbrendű növényeknek gyorsan és hatékonyan kell alkalmazkodniuk a környezeti feltételek alakulásához. Az egyik legfontosabb ilyen tényező a nappalok és éjszakák 24 órás rendszerességű ismétlődése, amely a fényviszonyok és a hőmérséklet jelentős változásaival jár. Ez az életfolyamatok világos és sötét szakaszoknak megfelelő átrendeződését igényli, ami a gének jelentős részének kifejeződését is érinti. A Shaeffer és mtsai (2001) által közölt expressziós vizsgálatok adatai szerint az *Arabidopsis* génjeinek kb. 10%-a napszakos kifejeződésű, azaz - definíciójuk szerint - transzkriptumaik mennyisége a nap folyamán legalább kétszeres különbséget mutat. A gének expressziójának napi változásaiért alapvetően két regulációs rendszer felelős. Az egyik az ún. diurnális szabályozás, amely közvetlenül a környezeti fényviszonyok által meghatározott. A másik a szervezet biológiai órájától függő cirkadián ("circa diem": nagyjából egynapos) reguláció, amely valamilyen, nagyjából 24 órás periódus szerint ismétlődő környezeti inger - rendszerint fény - általi beállítását követően állandó környezeti körülmények mellett is biztosítja a génkifejeződés napi periodicitását (Nozue és Maloof, 2006).

## 2.4.2.1. A növények hormonális folyamatainak diurnális szabályozása

A növények döntő többsége a fotoszintézis révén termeli meg a számára szükséges szerves vegyületeket és energiát, ezért fejlődésükre a fény minden életszakaszban fontos befolyással van. Fény szabályozza a csírázást és a csíranövények morfogenezisét, a fototropizmus és árnyékkerülés révén a növekedés irányát, a színtestek és gázcserenyílások mozgását, valamint a napi megvilágítottság hosszán keresztül a virágzás szezonális időzítését (Sullivan és Deng, 2003). A növény

életfolyamatai közvetlenül reagálnak a fényintenzitás változásaira az ún. akut fényválasz útján. Ez a folyamat igen fontos a biokémiai és élettani funkciók finom szabályozásában és összehangolásában. Mindezen túl akut fényreakció eredménye a növény cirkadián órájának beállítása is, ami a fény és sötét szakaszok várható változásaira készíti fel szervezetüket. A környezeti fényhatásokat a növények jól meghatározott elnyelési tulajdonságokkal rendelkező fotoreceptorok útján érzékelik, és válaszreakcióik az érzékelés során elinduló jelátviteli láncok hatásán keresztül alakulnak ki.

A növények a fényt három hullámhossztartományban érzékelik. A 280-320 nm közötti régióba eső UV-B receptora jelenleg ismeretlen, és igen kevés információ áll rendelkezésre az UV-B hatást közvetítő jelátviteli utakról is. A 320-400 nm-es tartományú UV-A és a kék fény érzékelésében a kriptokróm, valamint a fototropin fotoreceptorok vesznek részt. A kriptokrómok flavoproteinek, amelyek a szinte valamennyi élőlénycsoportban megtalálható, és az UV általi DNS károsodás javítását végző fotoliázokkal mutatnak szerkezeti hasonlóságot. *Arabidopsis*ban a *CRY1* és *CRY2* gének által kódolt két kriptokróm forma elsősorban csíranövények fényfüggő morfogenezisét, a virágzást, valamint a cirkadián óra beállítását meghatározó jelátviteli utak aktiválásáért felelős. Ugyanebbe a hullámhossztartományba eső fény érzékelésére képesek a fototropinok is, amelyeket *Arabidopsis*ban szintén két gén: az *NPH1* és az *NPL1* kódol. A fototropinokról kiinduló jelátviteli utak a gázcserenyílások és kloroplasztiszok fényfüggő mozgását, valamint a fototropizmust szabályozzák (Sullivan és Deng, 2003).

Az Arabidopsis esetében a vörös fény érzékelését öt fitokróm (PHYA, B, C, D és E) biztosítja. Ezek közül az egymáshoz igen hasonló szerkezetű, és szerepüket tekintve is átfedő fotoreceptorok közül említésre érdemes a PHYA néhány eltérő sajátossága. Ez a fitokróm a többitől eltérően fényben instabil. Míg sötétben csírázó növényekben az összes fitokrómok mintegy 85%-át adja, zöld csíranövényekben mennyisége csupán 5% (Sharrock és Clack, 2002). Ezen kívül a PHYA-t megkülönbözteti a többi formától jóval nagyobb fényérzékenysége, továbbá az is, hogy érzékelési tartománya részben átfed az UV-A és kék fotoreceptorokéval. A fényben stabil fitokrómok közül a PHYB a leggyakoribb forma mind sötétben, mind világosban csírázó növénykékben, ahol előfordulási aránya 10, ill. 40% (Sharrock és Clack, 2002). Funkcióit tekintve is ez a legjobban jellemzett fitokróm, amely olyan fontos élettani folyamatok szabályozásában vesz részt, mint a csírázás, fényfüggő morfogenezis (ún. de-etioláció), árnyékelkerülés, virágzás indukció, valamint a cirkadián óra beállítása (Sullivan és Deng, 2003).

A fotoreceptorok fény hatására olyan - rendszerint foszforilációs lépésekre épülő - jelátviteli utakat aktiválnak, amelyek sejtmagi transzkripciós regulátorok működését befolyásolva szabályozzák a fényregulált gének kifejeződését. Számos ilyen gén fény általi kontrollja nem függ a megvilágítás hullámhosszától, így ezeket több fotoreceptor típus szignálrendszere együttesen, átfedő módon szabályozza. Az egyes fotoreceptor családok, vagy ezeken belül pl. az egyes kriptokróm, ill. fitokróm formák génexpressziós hatásának specificitása jelenleg is a fotobiológia egyik intenzíven kutatott területe (Gyula és mtsai, 2003).

#### 2.4.2.2. Cirkadián reguláció

Az egyes élettani funkciók intenzitásának cirkadián váltakozása valamennyi élőlénycsoportra jellemző jelenség, ami a nappalok és éjszakák rendszeres váltakozásához való alkalmazkodás során alakult ki. Az ennek szabályozásáért felelős cirkadián biológiai óra működésének elve hasonló a fotoszintetizáló baktériumokban, gombákban, rovarokban, emlősökben és növényekben, de e rendszerek molekuláris komponenseinek jelentős különbségei arra utalnak, hogy kialakulása az egyes nagyobb élőlénycsoportokban jórészt párhuzamos fejlődés eredménye (Young és Kay, 2001). A napszakosan ismétlődő környezeti - elsősorban fény - jelek által naponta újra beállított cirkadián órának fontos szerepe van a szervezet felkészítésében a külső körülmények várható változásaira. Állandó környezetben pedig több napon át biztosítani tudja az általa szabályozott folyamatok - pl. egyes gének kifejeződésének közel 24 órás ciklikusságát.

Laboratóriumi körülmények között a cirkadián óra által szabályozott gének működését változatlan környezetben tanulmányozzák, és kifejeződésüket néhány jellegzetes paraméterrel jellemzik. Ezek legegyszerűbben egy sematikus expressziós görbe (5. ábra) segítségével ismertethetők. Periódushossznak az oszcilláló görbe két azonos helyzetű (pl. két maximum) pontja közti, 24 órához közeli időt nevezzük. Az expresszió a beállítástól eltelt idő ("zeitgeber" time, ZT) függvényében ábrázolható, aminek kiindulási pontja (ZT = 0) mindig az utolsó megvilágítási szakasz kezdete. A kifejeződés fázisa a ciklikus jelleggörbe egy jellemző pontjának, rendszerint első maximumának helyzete a ZT időskálán. A jelleggörbe amplitúdója pedig a ciklusok maximum és minimum értékei közti ingadozás fele.





A cirkadián óra által meghatározott folyamat egy mérhető paraméterének változása az idő függvényében. A beállító sötét, ill. világos fényperiódusokat fekete, ill. fehér, a folyamatos fényben az éjszakáknak megfelelő ún. szubjektív éjszakák idejét szürke szakaszok jelzik az időtengelyen. A ZT 0 időpont az utolsó megvilágítás kezdetének felel meg. A ritmus fázisa a jelleggörbe egy jellemző pontjának (általában első maximumának) a ZT 0-tól mért időbeni távolsága órákban kifejezve. A periódushossz a görbe két azonos (pl. maximum) pontja közti idő. A cirkadián ciklus amplitúdója a minimum és maximum értékek különbségének fele.

A cirkadián szabályozás több élőlény csoportban történt párhuzamos kialakulása erősen valószínűsítette, hogy e mechanizmus szelekciós előnyt biztosít az egyes élőlények számára (Harmer és mtsai, 2000). Először cianobaktériumok (Cyanophyta) és rovarok esetében bizonyították kísérleti adatokkal, hogy a környezeti hatások és a cirkadián reguláció közti összhang hiánya jelentősen hátráltatta a vizsgált egyedek fejlődését, vagy csökkentette életképességüket (Ouyang és mtsai, 1998; Klarsfeld és Rouyer, 1998; Saunders, 1972). Növények esetében már régóta ismert volt, hogy állandó fényben nevelt paradicsom egyedek rosszul fejlődnek és kevés termést hoznak (Highkin és Hanson, 1954). Újabban a cirkadián óra működésében sérült mutáns *Arabidopsis* csíranövényeken végzett vizsgálatokkal meggyőzően bizonyítható volt, hogy a környezeti hatások és a belső ritmus egyezésének hiánya jelentősen hátráltatja az egyedfejlődést, és hogy ez legalább részben a fotoszintézisen alapuló metabolikus funkciók összehangoltságának hiányával magyarázható (Dodd és mtsai, 2005).

A cirkadián szabályozás legfontosabb feladata valószínűleg az, hogy az élőlény számára előre jelzi a környezeti tényezők várható változásait, lehetővé téve, hogy

szervezetük ezekre megfelelően felkészülhessen. Ezáltal biztosítható például, hogy egymással nem összeegyeztethető biokémiai folyamatok - éjjeli, ill. nappali időzítéssel - jó hatékonysággal működhessenek egyazon sejtben. Ennek jelentőségét a növények számára jól illusztrálja, hogy egy átfogó vizsgálat során az *Arabidopsis* gének 16%-a bizonyult cirkadián-reguláltnak (Edwards és mtsai, 2006).

A fényhatás a növényi szervek szintjén hormonális közvetítéssel érvényesül, amelyet gyakran a hormon-bioszintetikus gének expressziós szabályozása determinál. A hormonszintézis egyes génjeinek fényfüggő regulációja jól dokumentált, pl. az etilén és a gibberellinek esetében. Ismert, hogy Arabidopsisban és salátában (Lactuca seriola) a fénynek induktív hatása van a gibberellin szintézis kulcsenzimeit kódoló génekre, elősegítve ezáltal a magok csírázását (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998). A gének egy részénél a fényreguláció egyértelműen a fitokróm fotoreceptorokhoz volt köthető, mások esetében viszont a hullámhossztól függetlennek bizonyult (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998; Ait-Ali és mtsai, 1999). Arabidopsisban az etilén bioszintézis aktivációját figyelték meg távoli vörös fénykezelést követően. Kimutatták, hogy ez a hatás hormonálisan is szabályozott, mert nem érvényesül etilén-inszenzitív növényekben, és a gibberellin szintézis specifikus gátlószereinek jelenlétében sem (Pierik és mtsai, 2004). A BR anyagcsere fényszabályozásáról igen kevés adat áll rendelkezésre. A BR-bioszintetikus gének gátlásáról szóló közlemények (Kang és mtsai 2001; Ma és mtsai, 2001) jó összhangban látszanak lenni a fény megnyúlást gátló hatásával, de érvényességüket erősen megkérdőjelezi, hogy a vizsgált gének egyikének sincs bizonyítható szerepe a BR-ok szintézisében (Fujioka és Yokota, 2003). A hormontartalom, valamint a CYP85 és CYP90 gének kifejeződésének vizsgálata alapján a fénynek inkább induktív hatása van a BR-bioszintetikus gének kifejeződésére, és általában a bioaktív BR-ok felhalmozódására (Symons és mtsai, 2002; Symons és Reid, 2003; saját adataink). Ezzel jól összeegyeztethetően a fény gátolja a BR-ok inaktivációjáért felelős BAS/CYP734A1 és CYP72C1 gének transzkripcióját (Turk és mtsai, 2003; Takahashi és mtsai, 2005).

Számos irodalmi adat van arra vonatkozóan, hogy a nem közvetlenül fényfüggő napszakos szabályozás közvetítésében is fontos szerepük van a fitohormonoknak. Cirkadián periodicitást mutattak ki a hormonszint és hormonválasz alakulásában pl. az auxinok (Jouve és mtsai, 1999; Covington és Harmer, 2007), etilén (Thain és mtsai, 2004) és a gibberellinek (Foster és Morgan, 1995) esetében is. A cirkadián szabályozás hatását a hormonszintézis génjeinek aktivitására először a burgonya

(Solanum tuberosum) egyik gibberellin 20-oxidázát kódoló *GA20ox1-3* bifázisos napi ciklusa alapján lehetett valószínűsíteni (Carrera és mtsai, 1999; Jackson és mtsai, 2000). Azóta az *Arabidopsis* teljes genomját reprezentáló "microarray" expressziós adatok alapján ismertté vált, a növények megnyúlásának cirkadián periodicitása jórészt a fitohormonok szintéziséért felelős és hatását közvetítő gének összehangolt cirkadián szabályozottságának következménye (Michaal és mtsai, 2008).

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Terjedelmi okok miatt a vizsgálataink során felhasznált anyagok és módszerek közül elsősorban azok bemutatására törekedtem, amelyek érdemi jelentőségűek voltak, és eredményeink értékelése, reprodukálása szempontjából fontosak. A széleskörűen alkalmazott molekuláris biológiai metodikákra csupán akkor térek ki röviden, ha azokat valamelyikét az általános sémáktól (Sambrook és Russell, 2001) eltérő módon alkalmaztuk.

### 3.1. Vegyszerek, szolgáltatások

A felhasznált vegyszerek mindenhol a kísérletek által megkívánt minőségűek voltak. Ahol fontos, ezek eredete és tisztasági foka is feltüntetésre került. Amennyiben ez pontosabban nem szerepel, az egyes fitohormoncsoportok reprezentatív képviselőiként a következő származékok kerültek felhasználásra: auxinként indol-3-ecetsav (IAA), citokininként 6-benzil-aminopurint (BAP), gibberellinként gibberellinsav (GA<sub>3</sub>), etilénként 1-amino-cikloprpán-1-karboxilsav (ACC), valamint abszcizinsav (ABA), szalicilsav (SA) és metil-jazmonát (MeJA) (valamennyi Sigma termék).

A kísérleteinkhez szükséges BR-ok többségét és ezek deutériummal jelölt megfelelőit Suguru Takatsuto (Joetsu University, Joetsu, Japán), a 24-epiBR vegyületeket Günther Adam (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Németország), míg az *in vitro* enzimreakciók vizsgálatához használt korai BR intermediereket Masaharu Mizutani (Kyoto University, Kyoto, Japán) laboratóriumában szintetizálták. Azonosságukat és homogenitásukat autentikus standard segítségével, gázkromatográfiás és tömegspektrometriás paramétereik alapján ellenőrizték. Az üvegházi munkák során nagyobb mennyiségben alkalmazott BL-ot részben kereskedelmi forgalmazótól (CIDtech Research, Inc., Missisauga, ON, Kanada) szereztük be. Valamennyi BR származékból 1 mM-os etanolos törzsoldatot készítettünk.

A munkánk során használt oligonukleotidák szintézise, valamint DNS mintáink szekvencia analízise az MTA Szegedi Biológiai Központ szolgáltató laboratóriumaiban történt.

## 3.2. Növényi anyag és nevelési körülmények

## 3.2.1. Felhasznált növényvonalak

Vizsgálatainkat *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) Columbia-0 (Col-0) ökotípusán, valamint az ebből létrehozott mutáns és transzgenikus vonalakon végeztük. A más laboratóriumokból származó, esetenként Columbia-3 (Col-3), C24, Landsberg erecta-0 (Ler-0), vagy Wassilewskija-2 (Ws-2) ökotípusú háttérben létrehozott, és a *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1* (*BRI1*), *CPD*, *DE-ETIOLATED 2* (*DET2*), *DWARF 4* (*DWF4*), *PHYTOCHROME A* (*PHYA*) és *PHYTOCHROME B* (*PHYB*) funkciókban sérült mutánsok adatai a 2. táblázatban láthatók. A paradicsommal (*Solanum lycopersicum*) végzett kísérletekhez a vad típusú, izogenikus GCR 358 vonalat (Practical Plant Genetics, Littlehampton, UK), valamint az azonos genetikai hátterű, BR-deficiens *extreme dwarf* (*d*<sup>K</sup>; Practical Plant Genetics) és *dwarf* (*d*, Tomato Genetics Resource Center, Davis, CA, USA) mutáns vonalakat használtuk.

mutáns	típus	háttér	hivatkozás
bri1-2/cbb2	funkcióvesztéses	C24	Altmann és mtsai, 1995
bri1-101/bin1-1	funkcióvesztéses	Col-0	Li JM és mtsai, 1997
cpd-2/cbb3	funkcióvesztéses	C24	Altmann és mtsai, 1995
dwf1-6/cbb2	részl. funkcióvesztéses	C24	Altmann és mtsai, 1995
det2-1	funkcióvesztéses	Col-3	Chory és mtsai, 1991
dwf4-1	funkcióvesztéses	Ws-2	Azpiroz és mtsai, 1997
phyA-201phyB-5	dupla funkcióvesztéses	Ler-0	Reed és mtsai, 1994

#### 2. táblázat: A felhasznált Arabidopsis mutánsok
#### 3.2.2. Nevelési körülmények

#### 3.2.2.1. In vitro kultúrák

A csíramentes növénykultúráknál a magokat 5%-os NaOCI oldatban történt felszíni sterilizálást és steril desztillált vizes mosást követően 1% szacharózzal kiegészített, 0,2% Phytagellel (Sigma) szilárdított Murashige-Skoog (MS) táptalajon csíráztattuk. A csíranövények nevelése klímakamrában (SANYO Electronic Co., Tottori, Japán) 22°C hőmérsékleten, fluoreszcens fehér megvilágítás (50-60 µmol foton/m<sup>2</sup>/s) alkalmazásával, 12 h fény/12 h sötét (LD: "light/dark") ciklusok mellett történt. Szükség szerint folyamatos fény (LL: "light/light") és folyamatos sötét (DD: "dark/dark") kezeléseket is alkalmaztunk. Egyes kísérletekben a fehér fényt helyettesítő monokromatikus vörös ( $\lambda_{max} = 660\pm 5$  nm), ill. kék ( $\lambda_{max} = 470\pm 5$  nm) megvilágítást Snaplite LED fényforrások (Quantum Devices, Inc., Barneveld, WI, USA) biztosították. Ezeknél a fényintenzitást (10-15 µmol/m<sup>2</sup>/s) úgy állítottuk be, hogy az hasonló legyen a más kísérletek során alkalmazott fehér fény vörös, ill. kék tartományba eső komponenseinek intenzitásával. A felhasznált maganyag létrehozása során a talajba ültetett növényeket üvegházban, 22±2°C hőmérsékleten neveltük, a csírázástól számított négy hétig rövidnappalos (8 óra fény/16 óra sötét), majd ezt követően termésérésig hosszúnappalos (16 óra sötét/8 óra fény) körülmények között.

A kísérletek során a hormonális és gátlószeres kezeléseket MS folyadékkultúrákban végeztük. A Phytagel-tartalmú MS táptalajról sterilen gyűjtött csíranövényeket műanyag petricsészékben levő tápoldatba helyeztük, és a megfelelő fény- és hőmérsékleti viszonyok mellett rázatva levegőztettük.

## 3.2.2.2. Üvegházi körülmények

Üvegházban az Arabidopsis vonalakat 22±2°C hőmérsékleten neveltük, a természetes megvilágítást szükség szerint fluoreszcens fehér fénnyel kiegészítve. A csírázástól számított négy hetes rövidnappalos (8 óra fény/16 óra sötét) növesztés után a növények virágzását hosszúnappalos (16 óra fény/8 óra sötét) megvilágítással indukáltuk. Kontrolláltan önbeporzott, egyedi növényekről származó magpopulációk előállításához az *Arabidopsis* egyedeket termésérésig ARACON hengerekben (Lehle

Seeds, Round Rock, TX, USA) neveltük. Üvegházi körülmények közt a paradicsom növények 25±2°C hőmérséklet mellett napi 16 h megvilágítást kaptak.

A hímsteril BR-deficiens mutánsokat BL-kezelt egyedekről gyűjtött magok segítségével tartottuk fenn. A vad fenotípus és a fertilitás helyreállítása érdekében a növényeket kétnaponta 20 nM BL-ot és 0,01% Triton X-100-at tartalmazó oldattal permeteztük.

## 3.3. Transzgenikus növények előállítása

## 3.3.1. Génkonstrukciókat hordozó növényi vektorok kialakítása

A transzgenikus vonalakba beviendő génkonstrukciók létrehozásához az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét és a nagy kópiaszámú pBluescript II (SK+) plazmid vektort (mindkettő Stratagene) használtuk. Ezután az izolált "transzgén" szakaszokat *Arabidopsis* esetében a pPCV812 T-DNS alapú plazmidból (Koncz és mtsai, 1994) származtatott, higromicin vagy glifozinát rezisztenciát hordozó bináris vektorokba építettük be, míg a paradicsomnál a kanamicin rezisztenciával ellátott pSLJ7291 vektort (Jones és mtsai, 1992) használtuk.

A felhasznált gének kódoló szekvenciái saját izolálású, vagy az Arabidopsis Stock Center (Nottingham) gyűjteményéből származó genomi és cDNS klónokból eredtek. A szükséges promóter szakaszok klónozásához azokat genomi DNS-ből PCR reakcióval amplifikáltuk. Riporterként az *E. coli* β-glukuronidázt (GUS) kódoló *uidA*, az észak-amerikai szentjánosbogár (*Photynus pyralis*) luciferáz (*LUC*), valamint a kristálymedúza (*Aequorea victoria*) zöld fluoreszcens proteint (GFP) kódoló génjeit alkalmaztuk. A létrehozott DNS konstrukció hibátlanságáról restrikciós mintázatuk és - szükség szerint - nukleotida-szekvenciájuk ellenőrzésével győződtünk meg.

#### 3.3.2. Stabil transzformáns növényvonalak létrehozása

A génkonstrukciókat tartalmazó pPCV plazmidokat a széles spektrumú mobilizációs funkciókat hordozó *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd ebből konjugáció révén a növény transzformációhoz Koncz és mtsai (1994) által kifejlesztett *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) törzsbe juttattuk. A vizsgálatainkhoz szükséges stabil transzgenikus *Arabidopsis* vonalakat gyökér-transzformációval (Koncz és mtsai, 1994), vagy a Clough és Bent (1998) által leírt, *Agrobacterium* svirág

infiltrációval hoztuk létre. Paradicsom esetében a sziklevél-transzformációs módszert (Jones és mtsai, 1992) alkalmaztuk.

Az antibiotikum vagy herbicid rezisztencia alapján azonosított primer transzformánsokból önbeporzást követően magot gyűjtöttünk. Ezek szegregációs analízise után rendszerint 10-10 olyan transzgenikus vonalat választottunk ki, amelyeknél a rezisztens és érzékeny utódok hasadási aránya 3:1 körüli volt. A kísérleteink során használt reprezentatív vonalakat a független izolátumokból származó homozigóta transzgenikus egyedek utódainak expressziós vizsgálata alapján választottuk ki.

#### 3.4. Mutánsizolálás

A CYP90C1, valamint CYP90D1 funkciókban deficiens mutánsokat Koncz Csaba laboratóriumában (Max Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) izoláltuk az általuk létrehozott, Col-0 hátterű, T-DNS inszerciós mutánsgyűjteményből, az ott kidolgozott PCR-alapú szűrési módszer (Ríos és mtsai, 2002) alkalmazásával. A felhasznált génspecifikus primerek a következők voltak (5'  $\rightarrow$  3'):

CYP90C1 (F) GGTGATCGGAGAAACCCTAAACTTCATC;

CYP90C1 (R) GATCTTCAAGTGAGATCGGAGAAGCAC;

CYP90D1 (F) GTCATCTTCAACAAGATCAACGGTCTCAG;

CYP90D1 (R) GTAATTTGTTCTTCATATGCACCGTTGGGAAG.

A *cyp90c1* és *cyp90d1* mutánsok (Koncz mutánsgyűjtemény: No. 8777, ill. 18430) homozigóta vonalait két, vad típussal történt visszakeresztezést követően önbeporzással hoztuk létre. A törpe fenotípusú *cyp90c1cyp90d1* kettős nullmutánst a *cyp90c1* és *cyp90d1* vonalak keresztezésével állítottuk elő. Izolálásuk és fenntartásuk során a mutánsok növények genotípusát *CYP90C1-* és *CYP90D1-*specifikus PCR reakciókkal ellenőriztük.

#### 3.5. Génexpressziós vizsgálatok

#### 3.5.1. Az mRNS-szintek meghatározása direkt módszerekkel

## 3.5.1.1. RNS izolálás

Az egyes transzkriptumok mennyiségi összehasonlításához az össz-RNS minták tisztítását a Chomczynski és Sacchi (1987) módszere alapján kifejlesztett TRIreagens (Sigma) felhasználásával végeztük a gyártó útmutatása szerint. Ennek során 1 g növényi anyagot folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 10 ml TRIreagensben szuszpendáltunk. Az extrakciót és particionáltatást követően a vizes fázisban maradó RNS-t izopropanollal kicsaptuk, centrifugálással összegyűjtöttük, etanollal sómentesre mostuk és megszárítottuk. Az RNáz-mentes vízben visszaoldott mintákat OD<sub>260</sub>-as abszorpciójuk alapján egységesen 2 mg/ml koncentrációra állítottuk be, és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

#### 3.5.1.2. Northern-blot hibridizáció

Northern-blot analízis során mintánként 20-20 µg RNS-t denaturáltunk, majd formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélen történt elektroforézissel frakcionáltunk. A gélek rövid etidium-bromidos festése után a 275 nm-es UV fényben fluoreszkáló RNS mintázatról fényképet készítettünk. Ezután a gélből az RNS-eket 20x SSC pufferben végzett kapilláris transzferrel Nytran N hibridizációs membránra (Schleicher & Schuell) kötöttük, majd 275 nm-es UV kezeléssel rögzítettük.

A hibridizációs próbát a megfelelő cDNS fragmentumból (20 ng) állítottuk elő Megaprime (Amersham) jelölő kit és [α-<sup>32</sup>P]dCTP felhasználásával. A membránhoz kötött RNS hibridizációját Church-pufferben (Church és Gilbert, 1984) végeztük 68°Con, majd stringens mosás után a membránon maradt radioaktív hibridizációs jeleket Phosphoimager 445 SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) készülék segítségével detektáltuk és értékeltük.

## 3.5.1.3. Reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR analízis

Az mRNS-szintek szemikvantitatív, reverz-transzkripcióval kapcsolt PCR (RT-PCR) módszerrel történő összehasonlításához 5 µg RNS mintából oligo-dT primer segítségével cDNS-t szintetizáltuk Ready-to-Go (Pharmacia Biotech) első szál szintézis kit segítségével. A PCR reakciókat a kapott cDNS 10%-ával végeztük olyan primerek felhasználásával, amelyek a vizsgált gének kódoló szakaszának 3' végéhez közeli, 250-350 bp-nyi terméket amplifikáltak. Az alkalmazott ciklusszámot a PCR

gén	primer	szekvencia (5' $\rightarrow$ 3')
<u>Arabidopsis</u>		
ATL2 (At3g16720)	ATL2-F ATL2-R	CGAGTTCTAGCTCTGGATTGACGG GGTTAACATTAAACCAATCAGACA
BRH1 (At3g61460)	BRH1-F BRH1-R	CCGAAACCCGCTCACCTTTCT GATAGAAAAGCGTGGCTTCTTCTA
CYP85A1 (At5g38970)	CYP85A1-F CYP85A1-R	GGACGTGAAGTCAATGAAGTTCACT TTCCTTACCAGGACAAAGCCTTGTC
CYP85A2 (At3g30180)	CYP85A2-F CYP85A2-R	CGAACCGCTCACTCTCGACGAT AATAGCTCTTTGATTCTAAGCTCT
CYP90A1/CPD (At5g05690)	CYP90A1-F CYP90A1-R	GAATGGAGTGATTACAAGTC GTGAACACATTAGAAGGGCCTG
CYP90B1/DWF4 (At3g50660)	CYP90B1-F CYP90B1-R	GAAGGAACTAGGAGAGTCAG CCACGTCGAAAAACTACCACTTC
CYP90C1/ROT3 (At4g36380)	CYP90C1-F CYP90C1-R	GGAGATGAAGAGGCGTAAATTGGA GCAAATACTGCTGTTTGCCGATCC
CYP90D1 (At3g13730)	CYP90D1-F CYP90D1-R	GTCAAATTCCTCTCTGATTCTCCTG TCGAGACCAGGGCACAATCTCTGAC
DET2 (At2g38050)	DET2-F DET2-R	AATCTCCTCAATGGTTATATC CGTGTACAGAAAAAATCCAATACC
DIM1 (At3g19820)	DIM1-F DIM1-R	CTCGAATGGGTCCACCGCGAAATG CATACAATTCACCATTAAACATTC
PR3 (At3g12500)	PR3-F PR3-R	AGACTTCCCATGAAACTACAGGTG GCTGAGCAGTCATCCAGAACCAAA
UBQ10 (At4g05320)	UBQ10-F UBQ10-R	GGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCT CTTATTCATCAGGGATTATACAAGGCC
paradicsom		
CYP85A1/D	tDW-F tDW-R	TTCTTTTGAAATTTTGAGGTGCATC CTCCCATATCTGGCTCTTTG
Actin	tACT-F tACT-R	ATTGCTCTTGACTATGAACAGG CTTGCTCATCCTATCAGCAATACC

3. táblázat: Az RT-PCR analíziseknél felhasznált fontosabb génspecifikus primerek

reakciók exponenciális tartományán belül az egyes transzkriptumok gyakoriságának megfelelően optimalizáltuk. Az ideálisan alacsony ciklusszám és a pontosabb értékelhetőség érdekében esetenként a reakciókhoz jelölőként [α-<sup>32</sup>P]-dCTP-t adtunk, és a termékeket autoradiográfiával detektáltuk. Az vizsgált gének és a konstitutív kontrollként használt *Arabidsopis POLIUBIQUITIN 10* (*UBQ10*), ill. paradicsom *Actin* specifikus primereinek szekvenciái a 3. táblázatban láthatók.

## 3.5.2. Promóter-aktivitás vizsgálata riportergének segítségével

## 3.5.2.1. β-Glukuronidáz-alapú analízisek

A transzgenikus növényekben a β-glukuronidáz (GUS) aktivitás hisztokémiai detektálását Jefferson (1987) módszerével végeztük. A mintavételt követő hatások kiküszöbölésére a növényeket a Puente és mtsai (1996) által leírtak szerint 2%-os formaldehid oldatban 10 percig fixáltuk. A GUS reakcióelegybe helyezett mintáknál az 5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-glukuronid (X-gluc) szubsztrát felvételét 10 másodperces vákuum-infiltrációval segítettük elő, majd az ezt követő hisztokémiai festést 12 órán át sötétben, 37°C-on végeztük. A reakcióelegy eltávolítása után a képződött indigó színezéket a növényi pigmentek 50%-os etanollal történt eltávolításával tettük láthatóvá.

A GUS aktivitások kvantitatív összehasonlítását a Jefferson (1987) által kifejlesztett spektrofluorimetriás módszerrel végeztük. A kivonó pufferben homogenizált növények sejtmentes felülúszóiból vett mintákat össz-protein tartalom alapján azonos koncentrációra állítottuk be, és szükség esetén felhasználásukig -80°C-on tároltuk. A mérések során a nagy tisztaságú 4-metil-umbelliferil-β-D-glukuronid szubsztrátból (Sigma) keletkező fluoreszcens termék mennyiségét 4-metil-umbelliferon standard segítségével, Quanta Master QM-1 spektrofluoriméterrel (Photon Technology, Inc., Birmingham, NJ, USA) határoztuk meg.

## 3.5.2.2. Luciferáz-alapú vizsgálatok

Kísérleteinkhez egyhetes, *LUC* riportergént hordozó transzgenikus csíranövényeket használtunk fel. A csíranövényekből 100-100-at kompakt csoportokat kialakítva friss táptalajra helyeztünk, majd ezeket a mérés kezdete előtt 36 és 24 órával steril, 25 mM-os D-luciferin (Biosynth A.G., Staad, Svájc) oldattal permeteztük. A

mérések a csíráztatás utáni 8. napon, a fényszakasz végén kezdődtek, ami konstans (LL, ill. DD) fényviszonyok mellett a ZT 12 időpontnak (ZT: "zeitgeber time", az utolsó fényperiódus kezdetétől eltelt idő) felelt meg.

Az in vivo lumineszcencia méréseket folyékony nitrogénnel hűtött, nagy érzékenységű CCD ("charge-coupled device") kamerával (LN-CCD-512-TKB, Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA), a Millar és munkatársai (1992a) által kidolgozott módszerrel végeztük. Az egyes növénymintákról kétóránként 25 perces digitális felvételeket készítettünk, majd az így rögzített lumineszcenciát Metamorph program (Meta 4.5 programcsomag, Universal Imaging) segítségével integráltuk. A főként fotoszintetikus pigmentektől eredő - késleltetett fluoreszcencia kiküszöbölése érdekében a mintákat már öt perccel az expozíciók kezdete előtt sötétbe helyeztük. A mért fotonszámot a kamera hátterével korrigáltuk, és az így kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Az egyes méréseket legalább négy alkalommal ismételtünk. jelentős А párhuzamos eredmények nem mutattak szórást. ezért az összehasonlításoknál ezekből rendre egy-egy reprezentatív adatsort használtunk fel.

## 3.6. "Differential display" mRNS analízis

A BR kezelés hatására bekövetkező mRNS-szint változások detektálására ún. differential display (DD RT-PCR) analízist (Liang és Pardee, 1992) végeztünk az RNAimage (GenHunter Corp., Nashville, TN, USA) rendszer felhasználásával, a gyártó által javasolt módszer szerint. Egyhetes csíranövényeket 2 órán át kezeltünk 100 nM BL-dal, 100 µM cikloheximid jelenlétében. A növény anyagból izolált RNS minták esetleges DNS szennyeződését RNáz-mentes DN-áz I (Boehringer) segítségével távolítottuk el. Az egyes RNS preparátumok 0,2 µg-nyi mennyiségeivel három párhuzamos reakcióban, 3'-végükön eltérő nukleotidát tartalmazó oligo-dT primerek felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk. A kapott termékek 10%-ának felhasználásával PCR reakciót végeztünk, melyben az eredeti oligo-dT és egy optimalizált, 13 nukleotidányi primer segítségével diszkrét méretű, <sup>32</sup>P jelölést hordozó DNS szakaszokat amplifikáltunk. Denaturáló poliakrilamid gélen történt frakcionálást követően az autoradiográfiával azonosított, eltérő abundanciájú transzkriptumoknak megfelelő PCR termékeket izoláltuk. Ezeket az eredeti primerekkel újra amplifikáltuk, majd megfelelő tisztítás után nukleotida-sorrendjüket meghatároztuk. A nukleotidaszekvenciák homológiája alapján azonosított mRNS-ek szintjének BRszabályozottságát Northern-hibridizációval ellenőriztük.

#### 3.7. Endogén BR-ok mennyiségi analízise

#### 3.7.1. BR-ok izolálása és tisztítása növényi mintákból

A BR tartalom analitikai vizsgálatához a növényi anyag friss tömegét megmértük, majd a mintákat folyékony nitrogénben megfagyasztottuk, és szükség esetén -80°C-on tároltuk. Liofilizálást követően a növényekből a hormon extrakciót és analízist Shozo Fujioka (RIKEN Advanced Science Institute, Wako, Japán), valamint Takao Yokota (Teikyo University, Utsunomiya, Japán) laboratóriumában végezték el.

Az extrakció és a minták előzetes tisztítása a Nomura és mtsai (2001) által leírt módon történt. A porított növényi anyagból a BR-okat metanollal extrahálták, majd ehhez a kivonathoz belső sztenderdként deuterált szintetikus BR formákat kevertek. A pigment és lipid tartalom nagy részét oldószeres particionáltatással távolították el, majd a mintákat szilikagél és aktív szén oszlopokon, ezt követően pedig reverz-fázisú HPLC kromatográfiával tovább tisztították. A biológiai aktivitás és az autentikus standardok retenciós értékei alapján azonosított BR tartalmú frakciókat kombinálták, majd beszárították.

#### 3.7.2. Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízis

A tisztított BR preparátumok gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) vizsgálata a Nomura és mtsai (2001) által leírtak szerint történt. A mintákban BR komponensek analízisét mono-, vagy bisz-metánboronáttal végzett derivatizálás után DB5 kolonnával felszerelt Shimadzu QP2010 GC-MS készülékkel végezték. A BR komponensek azonosítása és mennyiségük meghatározása a deuterált belső standardok segítségével történt.

## 3.8. Heterológ rendszerben kifejeztetett citokróm P450 enzimek jellemzése

## 3.8.1. Heterológ expresszáltatás rovarsejtekben

A CYP90C1 és CYP90D1 cDNS-eket teljes kódoló régióit megfelelő orientációban a pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) plazmidba klónoztuk. Az

enzimeket az így előállított rekombináns bakulovírus DNS-sel transzfektált *Spodoptera frugiperda* (Sf9) rovarsejt szuszpenziós kultúrájával fejeztettük ki a vektor forgalmazójának útmutatásai szerint. A megfelelő hem beépülés érdekében a tápfolyadékot 5-amino-levulinsavval (200 µM) és Fe(II)-citráttal (200 µM) egészítettük ki.

A tenyésztett rovarsejtekből a P450 tartalmú mikroszóma frakciót az Ohnishi és mtsai. (2006a) által leírt módon izoláltuk. Az ultrahangos feltárást követően differenciált centrifugálással tisztított mikroszóma preparátumokban a CYP90C1 és CYP90D1 jelenlétét SDS-poliakrilamid gélelekroforézissel, aktivitásukat pedig hem csoportjuk 450 nm-es Soret-spektruma alapján ellenőriztük. A mintákat azonos P450 koncentrációra állítottuk be, és felhasználásukig alikvotokban tároltuk -80°C-on.

## 3.8.2. Biokémiai karakterizálás

Az in vitro enzimreakciókat Ohnishi és mtsai. (2006a) módszere szerint állítottuk össze. Az 1 ml-es reakcióelegyek 50 pmol P450-et tartalmazó mikroszóma preparátumot, 0,1 U általunk tisztított *Arabidopsis* NADPH-P450-reduktázt, NADPH-t (1 mM) és BR szubsztrátot (20 mM) tartalmaztak. A 30°C-on 30 percig folytatott reakciók végén a mintákat 0,5x térfogat etilacetáttal háromszor extraháltuk, majd a szerves fázisba került BR származékokat bepárlással koncentráltuk. Ezek derivatizálása és GC-MS analízise a már ismertetett eljáráshoz hasonlóan, a Fujita és mtsai (2006) által leírt módon történt.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

# 4.1. A BR bioszintézist és szignálátvitelt érintő mutánsok azonosítása és jellemzése

#### 4.1.1. Az Arabidopsis cpd mutánsának karakterizálása

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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 deetiolation in *Arabidopsis*. Cell 85: 171-180]

Az 1990-es évek elejére az *Agrobacterium tumefaciens* tumorindukáló (Ti) plazmidjának felhasználásával olyan növényi vektorokat alakítottak ki, amelyek az ún. T-DNS régiójuknak a genomba való integrálásával tipikusan funkcióvesztéses mutációkat idéztek elő (Koncz és mtsai, 1992). A módszer hatékonnyá válásával lehetővé vált, hogy az *Arabidopsis* akkorra már jól karakterizált, izogenikus Col-0 vonalából célzott szűrésekre alkalmas mutánsparkokat hozzanak létre. Koncz Csaba laboratóriumában (Max Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) az általuk kialakított első T-DNS inszerciós mutánsgyűjteményből (Koncz és mtsai, 1992) öt olyan vonalat választottak ki részletes vizsgálatra, amelyek rendellenes hipokotilés/vagy gyökérnövekedésük mellett pleiotróp fenotipikus jegyeket is mutattak. Mindezek alapján várható volt, hogy ezek mutációi az egyedfejlődés egy-egy szabályozó faktorának hiányát okozzák. Ezen mutánsok egyike volt az extrém törpe fenotípusú vonal, amelynek az analízisébe bekapcsolódtunk.

Munkánk célja a mutáció által érintett molekuláris szabályozó mechanizmus(ok) azonosítása, valamint a mutáció pontos hatásmódjának tisztázása volt. Ennek keretében meg kívántuk határozni a mutáció helyét és az általa érintett gént, majd komplementációval ellenőrizni akartuk, hogy valóban ez felelős a valamennyi fenotipikus bélyeg kialakulásáért. Eredményeink függvényében karakterizálni kívántuk a gén által kódolt proteint, és felderíteni annak funkcionális kapcsolatát az ismert, növekedést és morfogenezist egyaránt befolyásoló regulációs folyamatokkal.

## 4.1.1.1. A cpd mutáns fenotípusának jellemzése

A vizsgált recesszív mutáció a sötétben nevelt csíranövényeknél jellegzetes, ún. de-etiolált fenotípust adott. Ennél - a vad típusú, etiolált kontrollal szemben - a rövid hipokotil mellett a hipokotilkampó hiánya, és szétnyílt sziklevelek láthatók (6. ábra A). A megvilágítás hiányában is a fényben nevelt növényekhez hasonló morfológiát eredményező mutációt ennek alapján *constitutive photomorphogenesis and dwarfism* (*cpd*) névvel jelöltük.

A sötétben nőtt csíranövények morfológiájának vizsgálata a sejtek növekedési zavarára utalt. A vad típussal összehasonlítva a hipokotil epidermális sejtjei egyenetlenek, rendezetlenek és rövidek voltak. A hipokotilon és a szikleveleken egyaránt sűrűn alakultak ki gázcserenyílások (6. ábra B-E).

A növekedési rendellenességeket természetes fényviszonyok mellett is észleltük. A *cpd* növények a vad típusnál mintegy hússzor kisebb méretűek voltak, és csökkent apikális dominanciát mutattak. A rozettában megvastagodott, epinasztikus levelek fejlődtek, amelyek lekerekítettek és rövid nyelűek voltak (6. ábra H-I). Ezek felszínén az epidermális sejtek körvonala a vad típusénál jóval kevésbé volt fodrozott, és gyakran képződtek rendellenes, duplikált gázcserenyílások (6. ábra F-G). A *cpd* levelekben a vad típusénál kevesebb mezofill sejtréteg fejlődött, és a paliszád sejtjeik is lekerekítettebbek voltak (6. ábra J-K). A virágzati tengely keresztmetszetében a xilémnél erőteljesebb floémképződés volt megfigyelhető, ami a kambium egyenetlen osztódása utalt (6. ábra L-M).

Míg folyamatos sötétben a Col-0 növények öt héttel a csírázás után is az etiolált csíranövényekre jellemző két szikleveles fejlődési stádiumban voltak, az ugyanilyen körülmények közt nevelt *cpd* mutánsnál - a fényben megfigyelhető fejlődéshez hasonlóan - számos tőlevél is kialakult (7. ábra A). A mutáns konstitutív fotomorfogenikus jellege a morfológiai jegyeken túl a génexpresszió szintjén is megnyilvánult. Míg a vad típusú kontrollban a jellemzően fényindukált sejtmagi gének által kódolt ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz kis alegység (RBCS) és a klorofill a/b-kötő fehérje (CAB) kifejeződése erőteljesen represszált volt, ezek mRNS-ei a *cpd* növényekben lényegesen nagyobb mennyiségben voltak jelen (7. ábra B). Az etiolációra jellemző megnyúlás hiánya és a fotoszintetikus gének fokozott aktivitása a mutánsban egyaránt a morfogenezis fényszabályozásának a zavarára utalt.



## 6. ábra: A cpd mutáns morfológiája

Sötétben nevelt *cpd* (A, jobbra) és Col-0 (A, balra) csíranövények. Rendellenes epidermisz és sztóma (nyilak) fejlődés a hipokotil felső részén (B) és a sziklevélen (C). A vad típusú kontrollénál (D) rövidebb sejtek és gázcserenyílások (nyilak) a mutáns hipokotilon (E). Természetes fényviszonyok mellett nevelt növények leveleinek felszíne (F: Col-0, G: *cpd*) és keresztmetszete (J: Col-0, K: *cpd*), valamint virágzati tengelyének keresztmetszete (L: Col-0, M: *cpd*) a floém (p) és xilém (x) jelölésével. A lépték jelölések 1 cm-nek (I), 200 (D), ill. 100 µm-nek (J és L) felelnek meg.



7. ábra: A cpd mutáns konstitutív fotomorfogenikus tulajdonságai

A: Folyamatos sötétben nevelt öthetes Col-0 és *cpd* növények. A mutánsnál jól megfigyelhető a rövid hipokotil és a valódi levelek kialakulása. B: Kéthetes csíranövényekből izolált RNS minták Northern-blot analízise. Megfigyelhető a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz kis alegységét és a klorofill a/b-kötő fehérjét kódoló *RBCS* (At1g67090), ill. *CAB1* (At1g29930) transzkriptumok nagyobb mennyisége a *cpd* vonalban. A hibridizációnál konstitutív kontrollként *POLYUBIQUITIN 10* (*UBQ10*) próbát használtunk.

## 4.1.1.2. A CPD gén azonosítása

A vad típussal visszakeresztezett mutáns utódai között a *cpd* mutáció együtt szegregált a higromicin rezisztencia markerrel, ami a genomba egyetlen kópiában inszertálódott, pPCV5013Hygr vektorból (Koncz és mtsai, 1989) származott. Triszómiás térképező vonalakkal végzett rekombinációs térképezés alapján a *cpd* mutációt a *transparent testa glabra (ttg)* marker közelében az 5. kromoszóma 14,3 régiójára lehetett lokalizálni (8. ábra A).

A mutáció fizikai térképezése DNS-hibridizációs kísérletekkel történt. Ehhez először *Mbo*l restrikciós endonukleázzal részlegesen emésztett *cpd* genomi DNS felhasználásával λEMBL3 fág vektorban génkönyvtárat készítettünk, majd ebből izoláltuk a mutációért felelős T-DNS-t hordozó klónt. A T-DNS-sel határos *Pst*I-*Hin*dIII restrikciós fragmentumot (8. ábra B) próbaként használva a CoI-0 RNS mintában Northern-hibridizációval egy 1700 bp körüli transzkriptumot lehetett azonosítani (9.

ábra A). Ugyanezen próba segítségével egy λgt10-ben létrehozott Col-0 cDNS könyvtárból négy klónt izoláltunk. Ezek közül a legnagyobb, 1608 bp-os inszerció (GenBank X87367) szekvencia analízise egy 1419 bp hosszúságú teljes kódoló régiót mutatott ki.

A cDNS és a mutáns genomi klón szekvenciájának ismeretében meghatározható volt a T-DNS inszerció helye, amit a kódoló részben az ATG startkodontól 3' irányban 10 nukleotida távolságra tudtunk lokalizálni. Az azonosított cDNS-sel való homológia alapján izolált vad típusú genomi klón nukleotida-szekvenciájának (GenBank X87367) meghatározása alapján ismertté vált, hogy a cDNS-t adó mRNS egy 3806 bp hosszú, nyolc exonból álló kódoló régióval rendelkező génből származott (8. ábra B).



8. ábra: A cpd mutáció kromoszómális helyzete és struktúrája

A: Kapcsoltsági térkép a T-DNS inszerció környezetéről az 5. kromoszómán. A vázlat feltünteti a térképezéshez használt marker lókuszok és egy, a régiót átfedő élesztő mesterséges kromoszóma (YAC) kontig helyzetét. B: A *CPD* gén szerkezete és a *cpd* mutációt okozó T-DNS inszerció. A promóter régiót nyíl, az exonokat vastagított szakaszok jelölik. A mutáció inszerciós helyénél (ék) a beépült, rekombinációval átrendeződött T-DNS struktúrája látható. Az ábrarész alsó vázlata a pPCV5013Hyg vektor T-DNS részének eredeti szerkezetét mutatja. A fontosabb géneket és a pPB322 plazmidból származó szakaszt szimbólumaik, a rekombinációs helyeket kettős törtvonalak jelzik. A restrikciós hasítási térképeken a *Bam*HI (B), *Eco*RI (R), *Hin*dIII, (H), *Kpn*I (K) és *Pst*I (P) hasítóhelyek vannak feltüntetve.

Azt, hogy a *cpd* mutáció fenotipikus hatásaiért valóban a térképezéssel azonosított gén a felelős, genetikai komplementációval lehetett bizonyítani. Ennek során a pPCV701 expressziós vektorba (Koncz és mtsai, 1994) beépítettük a teljes, 1419 bp méretű cDNS-t (10. ábra A), majd ezzel a konstrukcióval transzformáltuk a *cpd* vonalat. A cDNS-t az *Agrobacterium* Ti plazmid mannopin-szintáz (*mas*) promóterének kontrollja alatt kifejező transzgenikus növényekben helyreállt a vad fenotípus (10. ábra D). A komplementált növényekből izolált DNS-en *CPD* cDNS próbával végzett Southern-hibridizáció autoradiogramján jól látszott a cpd allél és a *CPD* cDNS jelenléte, valamint a vad *CPD* allél hiánya (10. ábra B). Az ugyanezen növényekből készült össz-RNS mintában Northern-hibridizációval kimutatható volt a *CPD* transzkriptum, amely az erős *mas* promóter-aktivitásnak megfelelően a vad típusú kontrollénál nagyobb (mintegy 20-szoros) mennyiségben halmozódott fel (10. ábra C). Mindezek az eredmények megerősítették, hogy a *cpd* mutáció következményeiért valóban a T-DNS inszerciót hordozó gén sérülése a felelős.



## 9. ábra: A CPD gén kifejeződése

A: Northern-hibridizációval kimutatott *CPD* transzkriptum Col-0 eredetű sejtszuszpenzióból (sz), valamint egyhetes Col-0 és *cpd* csíranövényekből (cs) izolált RNS mintákban. B: A *CPD* mRNS relatív mennyisége az *Arabidopsis* egyes szerveiben. A Northern-hibridizációs vizsgálatokat mintánként 20-20 µg össz-RNS-sel végeztük.



#### 10. ábra: A cpd mutáció komplementálása

A: A *cpd* gén szerkezetének (felső sor), valamint a komplementációhoz használt, pPCV701 alapú vektor T-DNS régiójának vázlata. A jelölések a 8. ábráéval részben azonosak, ill. a következők: neomicin-foszfotranszferáz (npt), valamint T-DNS eredetű *Ag7* terminátor (Ag7), bidirekcionális *mas* promóter (pmas), *nos* promóter (pnos) és *Ag4* terminátor (Ag4). A nyilak a gének, ill. szabályozó szekvenciák irányát, az ékek a *Hin*dIII endonukleáz hasítóhelyeit mutatják. A betűkkel jelölt *Hin*dIII fragmentumok B panelen azonosítottaknak felelnek meg. B: Southern-blot autoradiogramja a komplementált *cpd* (cpd kompl.), *cpd* és Col-0 DNS-ek *CPD* cDNS próbával detektált *Hin*dIII fragmentumaival. A betűk az A panelen feltüntetett szakaszokat jelölik, X: a *mas* promóter-*CPD* kapcsolódást tartalmazó fragmentum. C: A B panelével azonos növényi anyagból származó RNS minták Northern-blotjának autoradiogramja a *CPD* cDNS próbával detektált *CPD* mRNS jelekkel. D: Öthetes Col-0 (balra) és komplementált *cpd* (jobbra) növények (felső kép), valamint tőlevelek (alsó kép) Col-0 (első két levél), *cpd* (harmadik levél) és komplementált *cpd* (utolsó három levél) növényekről.

# 4.1.1.3. A CPD kifejeződésének hatása egyes "stresszgének" aktivitására

Tekintettel arra, hogy a *cpd* mutáció markánsan megváltoztatta a morfogenezist és a fényszabályozott *RBCS* és *CAB1* kifejeződését, megvizsgáltuk, hogy természetes

fényviszonyok (LD) mellett a *CPD* expresszió szintjének változásaiból adódó szuboptimális fiziológiás viszonyok befolyásolják-e ismerten stressz-indukált gének aktivitását. Ilyen körülmények között - szemben a sötétben nevelt csíranövényekkel - a *RBCS* és *CAB1* transzkriptumok szintjét a *CPD* hiánya vagy túltermelődése nem befolyásolta. Szintén változatlannak bizonyult az alkalikus peroxidáz (*PRXR1*), réz-cink szuperoxid-diszmutáz (*CSD1*), glutation-S-transzferáz (*GST2*), 70-es hősokk-protein (*HSP70*) és a ligninképző peroxidáz (*PER21*) kifejeződése. Ezzel szemben a *cpd* növényekben a chalkon-szintáz (*CHS*), lipoxigenáz (*LOX2*), S-adenozilmetionin-szintetáz (*SAM1*), 18.2 hősokk-protein (*HSP18.2*) és alkohol-dehidrogenáz (*ADH1*) transzkriptumok erőteljesebben halmozódtak fel, míg ugyanezen mRNS-ek mennyisége a vad típusú és komplementált *cpd* vonalakban nem mutatott érdemi különbséget. Ezekkel a stressz-reszponzív génekkel ellentétben a patogén-indukálható *PR1*, *PR2* és *PR5* transzkriptumai a *cpd* mutánsban a vad típusénál alacsonyabb, a komplementált növényekben pedig magasabb szintet mutattak (11. ábra).



11. ábra: Fény- és stressz-regulált gének mRNS szintjének összehasonlítása *cpd*, ill. *CPD*-túltermelő növényekben

Kéthetes, rövidnappalos körülmények közt nevelt csíranövények össz-RNS mintáival (20-20 µg) végzett Northern-hibridizációs kísérletek autoradiogramjai. Próbaként a következő proteinek cDNS szekvenciáit használtuk: ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz kis alegység (RBCS); klorofill a/b-kötő fehérje (CAB1); alkalikus peroxidáz (PRXR1, At4g21960); réz-cink szuperoxid-diszmutáz (CSD1, At1g08830); glutation-Stranszferáz (GST2, At4g02520); hősokk-protein 70 (HSP70, At5g49910); ligninképző peroxidáz (PER21, At2g37130); chalkon-szintáz (CHS, At5g13930); lipoxigenáz (LOX2, At3g45140); S-adenozilmetionin-szintetáz (SAM1, At1g02500); hősokk-protein (HSP18.2, At5g59720); alkohol-dehidrogenáz (ADH1, 18.2 At1q77120); PATHOGENESIS-RELATED 1 (PR1, At2g14610); β-1,3-glukanáz (PR2, At3g57260); PATHOGENESIS-RELATED 5 (PR5, At1g75040).

#### 4.1.1.4. A CPD gén egy citokróm P450 monooxigenázt kódol

Szekvenciájának vizsgálata alapján a *CPD* gén nyolc exont tartalmaz, amelyekkel az ismert cDNS szekvenciák (ún. EST-k) közül számos komplementernek bizonyult. Ezek eredete arra utalt, hogy a *CPD* az *Arabidopsis* valamennyi szervében kifejeződik. Ezt megerősítették Northern-hibridizációs analíziseink, melynek során a csíranövényekben és virágokban a tőlevelekénél magasabb, míg a gyökérben, virágszárban és zöld becőkben annál alacsonyabb mRNS-szintet tudtunk detektálni (9. ábra B).

A CPD cDNS egy 472 kodonból álló, 53785 Da molekulatömegű fehérje terméket kódolt. Ennek aminosav-szekvenciája jól felismerhető homológiát mutatott az adatbázisokban elérhető néhány citokróm P450 monooxigenázéval, elsősorban ezek sejtmembránhoz kapcsolódó, prolin-gazdag, valamint oxigén- és hem-kötő régióiban (12 ábra). Valamennyi jellegzetes domén megléte és a hem-kötő motívum rendkívül konzervált aminosavainak egyezése egyértelműen jelezte, hogy a CPD termék egy endoplazmatikus retikulumra jellemző, funkcionális P450 enzim.

A *CPD* az ismert P450-ek közül a kukoricából (*Zea mays*) azonosított Dwarf3mal (gibberellin 13-hidroxiláz; Winkler és Helentjaris, 1995) mutatta a legmagasabb szintű (28%) aminosav-szekvencia egyezést. Ez a P450 nomenklatúra szabályai (Nebert és mtsai, 1991) szerint azt jelentette, hogy a CPD egy önálló, új P450 csoport, a CYP90 család prototípusának tekintendő.

#### 4.1.1.5. A cpd mutáns fenotípusának helyreállítása BR származékokkal

Ismert volt, hogy a fitohormon szabályozás defektusai törpeséget okozhatnak. Több ilyen jellegű Arabidopsis mutánst is leírtak, melyekben a gibberellinek szintézise vagy érzékelése (Koornneef és van der Veen, 1980; Koornneef és mtsai, 1985), az auxinok (Wilson és mtsai, 1990) vagy az etilén (Kieber és mtsai, 1993) szignálátviteli folyamatai sérültek. Tekintettel arra, hogy a növényi P450-ekről rendelkezésre álló gyér ismeretek mellett is ismert volt, hogy ezen enzimeknek szerepük van néhány fitohormon szintézisében (Durst és Nelson, 1995), megvizsgáltuk, hogy a *cpd* növények törpe fenotípusa menekíthető-e az ismert fitohormonokkal való kezeléssel.

	< horgony dom.	> < Pro dom.>
CYP90 CYP88 CYP71B1 CYP76A2 CYP73 CYP2B1 CYP21A2	DAPTOP AND MLGVGMAAAVLLGAVALLLADAAARRAHWWYYREAAEAVLYG VABV MDGY EWENSYVP MDGY MEPT TO MLLLG	USSITAAGIALLIRETRYRRWGLPEGSLG-LIJLGETGOL-IGA VVDAALVIGASMERAALGAARGARDPEGEMG-WPIVGGWWAF-LRA 90 IVAALVIGASMILAKSKRKPKKNLPEGPPLENFITGNLHOLG- 47 FSALILDAFIDFFSGKNTTKSSYKFPEGPFG-WFIFGNMLGVG- 52 IEKTLVALFAAIIGAILISKTTGRHPEGPRG-VFIFGNMLGVG- 49 ILLLUGGINLMVGSHFSGCNFPGPRF-VFIFGNMLGVG- 49 LLLLGARMAWNWKLRSLHIPPLAPGPHBLQPDLPIYLLG- 51 P P G R
YKTENPEPF FKSGKPDAS EKPHRA TEPYKK DDLNHRN LLNS	DERUARYCS UEMTHIAGGETIIFSADTEMNRPULONEGKLEEGS ASFURE GRIGVIRSIMITSSTVLVTTAEGCKQVLMDDDAFVT VIELSKTYCPLMSLKIGSVTHVVATSVETVRDVUKTVDLEC-GRPVM MAVLROKUCPLMSLKIGSTYMVVQTAQASEELFKNHDISS-ANRVIP JIDLARE GELLLLRMGQRILVVVSEDLAREVIHTOGVES-ANRVIP MQLREKYCPUTVHHOPRIVVMLCGTDIKEALVGQAEDS-SGRGTI LTOKFGPIYLRHIGLQDVVVLNSKRHIEEAMVKKMADS-AGRPEP G R	-YPASHCNATCKHSULLWKCSTHKRMHSIAMSFANSSIHKDHLMLDID 150 GMEKATVARVGPRSFVAMPYDENRAIRKANAAPINGFDALTGYLFPID 191 TYPARITYNYKDLV-FSPYDKYMRQVKKMYVELYTAKRYQSFRHIRE 147 DVNQAHSYYQSL-AIAPYGPFWRFQRRICTIEMFVHKKISETEPVRR 150 AVIEPFKEYGGUV-TYVSEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQQYRYGME 150 AVIEPFKEYGGU
RIVRF RTVTS EEVASFVRF KCVDNMLKW AEAAAVVDD TMRDF QI-TQEFCE	NDS-NESRYLLMSEANKIGFEITÜKOLMSEDEGE SRA-MADHGGSVEFLTELRRMTFKIIVQIELGEA KQA-ASSEETVNLSQILKMSGSÜTCHIGGINL KKNPAAATEGIVIRREVLASFNMLGNLISKSL XKKNPAAATEGIVIRRELQLMMYNNMFRIMSERF MGK-RGVEERIGESCLVESIKSSGAPPETFLFQCITANII XMRAQPGTPUAIBEEFSLLGCSIICYLTGGDKI	
STTY GFAY AVDYFPVIG VSDIFPFLK QSFEYNYGD PGAH IQIVDVIPF		<pre><oxigén-kötő dom.=""> AAAAAAADG25D531VD5TVAAAAAY EVISTIMULAAK 292 DREINQDERGRHLDDD5T19VAAVVIANGEBSSGHETMAATV 342 IDHULAMERGEGSLGEYELTRBHTKGIIMNIFAGIDHSAQTNMAMT 310 DVAMEFQ-GTGKDEPAK-LGEHEBKIBVLENUFUNAAT DUKADIG-HILEAKERGENTENDIVIYUVENINAAISTIMSISSVEMALT 323 UKADIG-HILEAKERGENTENDIVIYUVENINAAISTIMSISSVEMALT 320 TYTARMEKEKSNHHEBHHENLMISTLSIFFAGTSSTLAVGEL 308 YMAGGVA-QPSMEEGSGQLLEGHVHAANDMIGGTSTANTISWAVV 306 T</oxigén-kötő></pre>
FLTETPLAL FLQENPDMF	< szteroid-kötő dom. OLASEBHÖKIRAMK-SDSYSKESVEFROCVVNSVLAVANII-G RAKABOBAIMRSIPSORGUTIRDFRKVEYLSOUIDSVLAVNS-F	> GUFREAMTDVELKGYRTFRGMKVFSSFEAVHLDENHEKDARFFNEMEN, 395 VSEROATRDVFVNGYLTFRGMKVQLWYRSVHMDRQVYFDFTK5DESRN 446
HILANDRVM EFLRHDEAM EFVNHDEIQ LMLKYDHVA HILHHDEIQ	KROASIREKIKNIDEITDDUVEQLDYRKUTLKEIFSISPIVPV KVKTEISQAIEPNRKFBOSDIENLEYNGAULKESRELHPPLPP KVKREIJDKLGEGVQITEPDVQNLEYLGAVKEITALKAADEL SKVQKBIDQVIGSHRUPLDDRSKNEYNDAVIHBIORFSDLVPI RHOBELDHELGPG-ASSSRVPYKDHARIELLNATIAEVHELRPVVPL E KE R	LUPERVIAKDLKHASYDVÜEKTMIHVNMVAVEMSISSIMKDPERVIERI LIPERTIODTKFMGYDVÄENDVOLVINAMIGRDEEKDDPMSGRUBER 424 LUPENMLHARLGSFDIPAESGLUNAMMIGRDECKDPMSGRUBER 421 GVPHRVTKOTMFRGULLERNTEVY-PILSSALDPOVERPHEF 407 ALPHRTTRPSSISGVDIPEGTVIIPNLGGAHLDETVWERPHEF 

< hem-kötő dom. >	
QSNSVTTEPSNVETERGEGERICEGYELARVALSWFHHRAVTGFSMVEAEQDKLVFFFTTTTQKRYPIEVKRRDFAT	472
EHSPRAGTELAGGLGARICCENDEAKLEISVETHERLLGYKLAKTNERCKVRYLFHERPVDNCLAKUTRVGS INQTDFKCLNFELLP <mark>FGGGPRMCCC</mark> MGMGLAVVHLTUINGLYRGDNKLPNGMKAEELSIEENYGLICVKKLPLEAIPVLTQWT	496
LSKIDVKCOHYGLIPFCACREMOVELPIGHRMMHFAIGSILREDENELEDGVSPKSINMDGSMGVTARKRDSLKVIPKKA LEEAKVEANONDFRYLPFCVCRESOFCIIMALPIGITIGRINONGEL-LPPIGQSKIDTDEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRSF	505 505
LANGALK-KSEAGMPTSTEKRICLEEGIARNEUFLETTIIN-FSVSSHLAPKDIDLTEKESGIGKIEPTYQICFSAR PRFLEPEKNSRALARGCEARVCLEEPMARLEHPVVTTELOAETL-LSSGDALPSLOPIEHCSVILKMOFBOVRLOPRGMGAHSPGOSO	484 495
FGGRCG LF P	

12. ábra: A CYP90 aminosav-szekvenciájának homológiája növény és állati eredetű P450 proteinekkel

A CYP90 és a vele számottevő aminosav-szekvencia egyezést mutató P450-ek: CYP88 (*Zea mays*, GenBank U32579), CYP71B1 (*Thlapsi arvense*, GenBank L24438), CYP76A2 (*Solanum melongena*, GenBank X71657), CYP73 (*Helianthus tuberosus*, GenBank Z17369), CYP2B1 (*Rattus norvegicus*, GenBank J00719), CYP21A2 (*Homo sapiens*, GenBank S29670). A maximális egyezést adó illesztéseknél a CYP90-nel egyező aminosavak sötét háttérrel szerepelnek. A szekvencia oszlopok fölött a konzervált régiók, alattuk a P450-ekre jellemző erősen konzervált aminosavak vannak megjelölve. Az ábra jobb oldalán a sorvégi aminosavak sorszáma látható. Kísérleteinkben a *cpd* növényeket az egyes hormonfajtákat tartalmazó MS médiumon DD és LD fényviszonyok mellett csíráztattuk és neveltük egyhetes korig. Ennek során az auxin, gibberellin és citokinin származékok, valamint az abszcizinsav, etilén, jazmon- és szalicilsav jelenléte nem befolyásolták számottevően a mutáns fenotípusát (nem bemutatott adatok). Markáns hatást és a vad típuséhoz hasonló csíranövény morfológiát eredményezett viszont egy BR származék, a BL alkalmazása, amely már 5 nM koncentrációtól a sejtek, és ezzel együtt a levelek erőteljes megnyúlását idézte elő (13. ábra B). Mivel ismert volt, hogy gombákban és állatokban a P450 monooxigenázoknak fontos szerep jut a szteroid hormonok, többek közt a BRokhoz szerkezetileg igen hasonló ekdizonok bioszintézisében (James, 1989), ez az



13. ábra: A cpd mutáns vad fenotípusa BR-okkal helyreállítható

A: A BR bioszintézis anyagcsereútja (Fujioka és mtsai, 1995a).

B: BR-mentes (-), ill. 200 nM kampeszterolt (CL), kataszteront (CT), teaszteront (TE), 3-dehidroteaszteront (DT), tifaszterolt (TY), kasztaszteront (CS), vagy BL-ot tartalmazó MS médiumon, DD (5 nap, bal oldali panelek) vagy LD (14 nap, jobb oldali panelek) körülmények közt nevelt *cpd* és Col-0 csíranövények fenotípusa.

eredmény arra utalt, hogy a CPD gén a BR anyagcsereút egy fontos P450 enzimét kódolja.

In vivo metabolit-konverziós kísérletek eredményeként ismertek voltak a BR bioszintézis főbb lépései (Fujioka és mtsai, 1995a; Suzuki H és mtsai, 1995; Choi és mtsai, 1997), ami lehetőséget kínált a CPD/CYP90 funkciójának pontosabb behatárolására. Várható volt ugyanis, hogy bár a cpd növényekben a BR-ok szintézise a mutáció következményeként valamelyik konverziós lépésnél elakad, a hiányzó enzim termékével, vagy az ezt követően képződő intermedierek bármelyikével kezelt mutánsban a biológiailag aktív BR-ok képződése helyreállítható. Ezen ún. "feeding rescue" kísérletek során cpd magokat csíráztattunk és neveltünk olyan petricsészékben, melyekben az MS médiumot egy-egy BR intermedierrel, illetve a szintézisút végtermékének tekintett BL-dal egészítettünk ki. A DD és LD körülmények közt elvégzett tesztben a korai prekurzoroknak számító kampeszterol és kataszteron hatástalannak bizonyult, ugyanakkor a teaszteron, 3-dehidroteaszteron, tifaszterol, kasztaszteron vagy BL a csíranövényeknek a vad típuséhoz hasonló fejlődését idézte elő (13. ábra A, B). Tekintettel arra, hogy a menekítési kísérletekben hatásos BR származékok közös vonása a C-23 pozícióban hidroxilált szteroid oldallánc volt, ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a CPD/CYP90 a BR-ok szintézise során a C-23 hiroxilációs lépést katalizálja.

#### 4.1.1.6. BR kezelés hatása más Arabidopsis hipokotil mutánsokra

Hasonló, hormonnal kiegészített médiummal végzett kísérletekkel vizsgáltuk, hogy a BR-ok miként hatnak más, rövid hipokotillal rendelkező *Arabidopsis* mutánsok növekedésére. A hipokotil-elongáció fénygátlásának hatását kiküszöbölendő ezeket a teszteket DD viszonyok mellett végeztük (14. ábra). A gibberellin bioszintézisben (*gai*) vagy érzékelésben (*gai*) sérült mutánsok BR (24-epikasztaszteron és 24-epibrasszinolid) kezelésre csupán kismértékű (< 20%) elongációval reagáltak. Hasonlóan elhanyagolható hatást tapasztaltunk az *eto1* etilén-túltermelő vonal esetében. Az etilén-inszenzitív *etr1*-nél ezzel szemben 50-80%-os hipokotil-növekedést lehetett előidézni. Az auxinra és etilénre egyaránt rezisztens *axr2* és a konstitutív fotomorfogenikus *det1* BR hatásra hasonló mértékű megnyúlással, valamint a sziklevelek kiterülésével és gyökér rövidüléssel válaszolt. Erőteljes (> 80%-os) elongációs hatás nyilvánult meg több tesztelt fotomorfogenikus mutáns (*cop1-16*, *dim1*), és embrióletális *fusca* mutáns (*fus4*, *fus5*, *fus6*-T, *fus7*, *fus8*, *fus9*, *fus11* és

*fus12*) esetében is, míg a *cop1-13*, *det3*, valamint *fus6*-G a kezelés hatására nem mutatott szignifikáns megnyúlást (14. ábra).



14. ábra: BR kezelés hatása sötétben nevelt Arabidopsis mutánsok hipokotiljának megnyúlására

Ötnapos, DD körülmények között csíráztatott és nevelt csíranövények. A képenként bemutatott négy-négy növény közül az első táptalaja hormonmentes volt (kontroll), a másodiké ergoszterolt (szteroid kontroll), a harmadiké 24-epikasztaszteront, a negyediké 24-epibrasszinolidot tartalmazott 100 nM koncentrációban.

# 4.1.1.7. A cpd mutáns vizsgálatának jelentősége

Bár az 1990-es évek közepére a BR-ok növekedést befolyásoló szerepéről igen sok empirikus adat gyűlt össze (Mandava, 1988; Sakurai és Fujioka, 1993), ezeknek a szteroidoknak a pontos élettani funkciói ismeretlenek maradtak. Míg a BR kezelés hatását több növényfaj esetében részletesen leírták, nem volt ismert, hogy miként fejlődnek a növények ezen regulátorok nélkül. A *cpd*, és a vele egyidejűleg BR-deficiens mutánsként azonosított *Arabidopsis det2* (Li JM és mtsai, 1996) és *cbb* mutánsok voltak az elsőként megismert olyan növények, amelyeken a BR szabályozás

hiányának morfológiai és funkcionális következményeit tanulmányozni lehetett (Clouse, 1996b).

Az erre vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásossága ellenére ma általánosan elfogadott, hogy BR kezeléssel javítható egyes haszonnövények stresszrezisztenciája - elsősorban szárazság- és hidegtűrése - a termésfejlődés időszakában (Mandava, 1988; Kamuro és Takatsuto, 1999; Krishna 2003). E hatás összefügghet azzal, hogy számos gén (Müssig és mtsai, 2002) és élettani funkció (Steber és McCourt, 2001; Rodrigues és mtsai, 2009; Zhang és mtsai, 2009) szabályozása tekintetében is a BR-ok az abszcizinsav antagonistáinak bizonyultak. A *CHS* és más stressz-reszponzív géneknek a *cpd* mutánsban tapasztalt indukciója összhangban van azokkal a korábbi eredményekkel, hogy az antocianin termelődés BR kezeléssel szuppresszálható (Mandava, 1988), és hogy a *CHS* más BR-deficiens vonalakban, például a *det2*-ben is fokozottan expresszálódik (Chory és mtsai, 1991). Újabban a *det2* esetében oxidatív stresszhatásokkal szembeni fokozott rezisztenciáról, és az ezt biztosító protektív gének aktivációjáról is beszámoltak (Cao SQ és mtsai, 2005).

Kevéssé ismertek azok a folyamatok is, melyek BR kezelést követően fokozzák a növények ellenállóképességét különböző patogénekkel szemben. A védelem széles spektruma és az ismert védekezési mechanizmusok szignálútjaitól való függetlensége a BR előkezelés egyfajta általános kondicionáló hatására utal (Nakashita és mtsai, 2003). Ezek a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az általunk is vizsgált patogénindukált proteinek dohány ortológjainak génjei BR kezelésre nem indukálódtak (Nakashita és mtsai, 2003). Ez megerősíteni látszik azt a feltevésünket, hogy a komplementált *cpd* növényekben a *PR* gének fokozott kifejeződését nem a fokozott BR szintézis, hanem a túltermelt, természetes redox-partner nélkül maradt P450-től eredő oxidatív szabadgyökök okozzák.

A CPD/CYP90 (jelenlegi besorolás szerint: CYP90A1) enzim katalitikus szerepe máig nem tisztázott. A *cpd* fenotípusának C-23 hidroxilált BR formákkal való menekíthetősége ellenére a C-23 funkciónak ellentmond, hogy a mutánsban GC-MS analízissel a korai intermediernek számító 22-hidroxikampeszterol (3. ábra) felhalmozódását tudtuk kimutatni (Ohnishi és mtsai, 2007), hogy a heterológ rendszerben kifejeztetett enzim *in vitro* a C-23 hidroxilációs reakciót nem, viszont a 22hidroxikampeszterol  $\rightarrow$  22-kampeszt-4-en-3-on (22-OH-4-en-3-on) C-3 oxidációs lépést (3. ábra) preferáltan katalizálta (Ohnishi és mtsai, 2007), és hogy az utóbb általunk azonosított, *in vitro* is aktív két C-23 hiroxiláz (CYP90C1 és CYP90D1) hiányában a vad *CPD* allélt hordozó növények is BR-deficiens törpe fenotípust adtak. Az *in virto* kísérletek alapján a *cpd* növényekben a szteroid-3β-oxidáz aktivitás hiánya lenne várható, viszont ennek nem 23-hidroxilált termékei a menekítési tesztekben inaktívnak bizonyultak (saját publikálatlan adataink). Mivel az *Arabidopsis* esetében CYP90A1-től független szteroid 3β-oxidáció, és több ilyen reakcióra képes, nem P450 enzim is ismert (Ohnishi és mtsai, 2007), a *cpd* növényekben e redundáns funkció hiánya nehezen tettenérhető. Mindenesetre a pontos biokémiai funkció ismerete nélkül is bizonyos, hogy CYP90A1 hiányában a BR-ok C-23 hidroxilációja gátolt, amit egyrészt az endogén 23-hidroxilált intermedierek rendkívül alacsony szintje, másrészt az ilyen növények fenotípusának 23-hidroxilált származékokkal való hatékony menekíthetősége is mutat.

Vizsgálataink során az *Arabidopsis* rövid hipokotilű mutánsai a BR kezelésre különbözőképpen reagáltak. Bár ezek közül később csupán a *dim1*-ről derült ki, hogy egy BR prekurzor szteroid szintézisének gátlása révén (Klahre és mtsai, 1998) BR-hiányos, a hormonkezelésre többük is a vad típusénál lényegesen erőteljesebben válaszolt. Ez valószínűleg részben a BR-ok más hormonok effektivitását is befolyásoló hatásának (Mouchel és mtsai, 2006), részben pedig annak köszönhető, hogy az optimális hosszúságú hipokotil sejtek BR hatására már csak korlátozottabb elongációra képesek (Clouse és mtsai, 1993).

#### 4.1.2. Az Arabidopsis cbb mutánsok jellemzése

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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]

A *cpd* mutáns funkcionális jellemzésével párhuzamosan egy másik, a Thomas Altmann laboratóriumában (Institut für Genbiologische Forschung, Berlin) *Ac/Ds* transzpozon inszercióval létrehozott mutánsgyűjtemény három törpe mutánsa (Altmann és mtsai, 1995) esetében is valószínűsíthető volt, hogy ezek BR-deficiensek, ill. - inszenzitívek lehetnek. A *cbb* (*cabbage*) vonalak, a *cbb1*, *cbb2* és *cbb3* vizsgálata révén újabb ismeretekre számíthattunk a BR szabályozás jelentőségére és szabályozására vonatkozóan.

Vizsgálataink célja annak felderítése volt, hogy a *cbb* mutánsok valóban a BR szabályozásban sérültek-e. Amennyiben igen, allelizmus tesztekkel tisztázni akartuk, hogy a három mutáció különböző géneket érint-e, és hogy ezek azonosak lehetnek-e a már ismert BR-bioszintetikus gének, a *CPD* vagy *DET2* (Li JM és mtsai) valamelyikével. Új funkciók esetén vizsgálni kívántuk a mutációk általános expressziós

hatásait is, főként olyan génekkel kapcsolatban, amelyeknek fontos szerepük lehet a sejtmegnyúlási folyamatokban.

# 4.1.2.1. A cbb mutánsok de-etiolált fenotípusúak

Az Arabidopsis Col-0-val azonos izolátumból eredő C24 ökotípusában létrejött *cbb* mutációk törpe fenotípust eredményeztek. Az üvegházban nevelt növények lekerekített, rövid nyelű leveleket fejlesztettek, a magasságuk kifejlett állapotban pedig a *cbb1*-nél mintegy 25, a *cbb2* és *cbb3* esetében pedig kb. 5-6%-a volt a vad típusénak. A mérsékeltebb fenotípusú *cbb1* fertilis virágzatot fejlesztett, az extrém törpe *cbb2* és *cbb3* mutánsok igen rövid tengelyen ülő virágai viszont terméketlenek voltak (15. ábra A-D).

A DD körülmények közt csíráztatott *cbb* mutánsok fenotípusa (15. ábra E) a szintén rövid hipokotilű, szétnyílt szikleveleket fejlesztő de-etiolált/konstitutív fotomorfogenikus (*det, cop*) mutánsokéra hasonlított (Chory, 1993; Deng, 1994). A vad



#### 15. ábra: Az Arabidopsis cbb mutánsok morfológiája

A: Háromhetes, talajban, hosszúnappalos viszonyok mellett nevelt vad típusú C24 (bal felső), *cbb1* (jobb felső), *cbb2* (bal alsó) és *cbb3* (jobb alsó) növények. B: MS médiumon LD ciklusban nőtt háromhetes növények. Balról jobbra C24, *cbb1*, *cbb2* és *cbb3*. C: Öthetes, talajban nőtt *cbb1* növény fertilis virágzattal. D: Hathetes, *in vitro* nevelt *cbb2* növény rövid, steril virágzattal. E: Sötétben 11 napig csíráztatott és nevelt csíranövények morfogenezise. Balról jobbra C24, *cbb1*, *cbb2* és *cbb3*.

típuséhoz viszonyítva a *cbb1* csíranövények hipokotiljának hossza csak 40% körül maradt, a *cbb2* és *cbb2* növényeknél pedig még markánsabb redukció volt megfigyelhető (4. táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy e tekintetben a *cbb* mutánsok viselkedése eltér a gibberellin-deficiens (*ga4-1*, *ga5-1*) és -inszenzitív (*gai-1*), szintén törpe mutánsokétól, mivel sötétben ezek hipokotil hossza a vad típusénak 60-80%-a volt, és a sziklevelek is normális etiolált fejlődést (szkotomorfogenezist) mutattak.

csíranövény	fényben nőtt		sötétben nőtt	
	mm	vad típus %-a	mm	vad típus %-a
0.1.0		100		100
Col-0	$3,0 \pm 0.63$	100	$18,0 \pm 0,14$	100
cbb1	$1,2 \pm 0,24$	40	$8,0 \pm 0,08$	44
cbb2	0,51 ± 0,13	17	1,1 ± 0,11	6
cbb3	0,54 ± 0,10	18	1,98 ± 0,03	11

4. táblázat: Fényben és sötétben nevelt cbb mutánsok hipokotiljának hossza

A csíranövények hoszúnappalos ciklusban, ill. sötétben csíráztak és nőttek 11 napig. Az adatok és szórás értékek 10-10 független mérésből származtak.

Egyhetes, fényben nevelt csíranövények hipokotil hosszmetszetének vizsgálata a mutáns növényekben a sejtek méretének és alakjának megváltozását mutatta. A mezofill sejtek a vad típusra jellemző elongáltsággal szemben jórészt izometrikusak voltak, és az egyes vonalakban a sejtek rövidülése jól korrelált a fenotípus erősségével (16. ábra B, E, H, K). Ez azt mutatta, hogy a *cbb* mutánsok törpeségét elsődlegesen a sejtmegnyúlás hiánya okozza.

# 4.1.2.2. A cbb mutánsok genetikai vizsgálata

A *cbb* mutációk egymáshoz, ill. a már ismert konstitutív fotomorfogenikus hatású mutációkhoz való viszonyát genetikai analízissel vizsgáltuk. Allélizmus teszttel kimutatható volt, hogy a *cbb1*, *cbb2* és *cbb3* léziók különböző lókuszokat érintenek. Megállapítható volt ugyanakkor, hogy páronként a *cbb3* és a *cpd*, valamint a *cbb1* és a szintén törpeséget okozó *dwf1* (Feldmann és mtsai, 1989) mutációk izoallélikusak.

A Konieczny és Ausubel (1993), valamint Bell és Ecker (1994) által kidolgozott molekuláris genetikai markerek felhasználásával a *cbb1* mutációt az *Arabidopsis* 3. kromoszómájának felső karjára lehetett térképezni, az nga 172-től 16,71 ± 6,9, az nga 162-től 3,9 ± 2,3, a *GAPA*-tól 21,18 ± 9,3 cM távolságra. Hasonló módon a *cbb2* helyzete a 4. kromoszóma alsó karjára (*DHS*-től 2,9 ± 1,6 cM), a *cbb3* pedig az 5. kromoszóma felső karjára (nga 151-től 7,6 ± 3,1, nga 106-tól 11,29 ± 6,6 cM) volt lokalizálható. A mutációk térkép pozícióiból megállapítható volt, hogy azok az ismert de-etiolált (*det1, det2* és *det3*) és konstitutív fotomorfogenikus (*cop1* és *cop9*) mutánsokétól különböző lókuszokat érintenek.

#### 4.1.2.3. Fitohormonok hatása a cbb mutánsok fenotípusára

Feltételezve, hogy a cbb mutánsok törpesége a hormonális szabályozás zavarából eredhet, megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolják fejlődésüket az ismert fitohormonok, valamint az ezek hatását módosító vegyületek. Kísérleteinkben egyhetes, LD fényperiódusokban MS táptalajon csíráztatott és nevelt cbb1, cbb2 és cbb3 csíranövényeket helyeztünk át friss, hormont (vagy hormon antagonistát) tartalmazó médiumra, majd a növények fenotípusát további egyhetes, változatlan körülmények közt való nevelés után értékeltük. A kiegészített médiumok 0,01-1 µM auxint (indol-3-ecetsav, 2,4-D), gibberellint ( $GA_3$ ,  $GA_4$ ), citokinint (kinetin), auxin transzport inhibitort (TIBA), vagy etilén bioszintézis inhibitort (AIB), továbbá jazmonsavat (7 µM), pCIB-t (auxin antagonista; 0,1-1 µM), etefont (etilénképző vegyület; 0,1-1 mM), vagy ezüstnitrátot (etilén érzékelés gátló; 100 µM) tartalmaztak. Mindezen kezelések során nem tapasztaltunk érdemi különbséget a vad típusú és a cbb csíranövények reakciói között. Jellemzően a GA<sub>3</sub> és GA<sub>4</sub> a levélnyelek minimális megnyújtásán túl nem befolyásolta a mutánsok fenotípusát, míg a gibberellin-deficiens (Koornneef és van der Veen, 1980) és -inszenzitív (Koornneef és mtsai, 1985) törpe Arabidopsis vonalak esetében azok vad fenokópiáját eredményezte.

## 4.1.2.4. A *cbb* mutációk a BR-függő növekedésre hatnak

A fent leírt fitohormon kezelésekkel ellentétben egy azonos módon alkalmazott BR származék, a 24-epikasztaszteron hatására a *cbb1* és *cbb3* növények fenotípusa a vad típusétól megkülönböztethetetlenné vált. Ezeknél a mutánsoknál a hipokotil,



16. ábra: 24-epibrassszinolid hatása a *cbb* mutánsok morfológiájára MS médiumon hosszúnappalos ciklusban nevelt kéthetes nevelt vad típusú C24 (A-C), valamint *cbb1* (D-F), *cbb2* (G-I) és *cbb3* (J-L) mutánsok. Az A, D, G és J képeken balról jobbra az egyes csíranövények médiuma hormonmentes volt, ill. 0,01, 0,1, vagy 1  $\mu$ M 24-epikasztaszteront tartalmazott. A mikroszkópos felvételeken bemutatott hipokotil hosszmetszetek hormonmentesen, vagy 1  $\mu$ M 24-epikasztaszteron jelenlétében nőtt kéthetes növényekből készültek. A lépték 100  $\mu$ m-t jelöl.

levélnyél és gyökér megnyúlását, valamint a levéllemez kiterülését tapasztaltuk, míg a *cbb2* fenotípusa 24-epikasztaszteron jelenlétében is változatlan maradt (16. ábra A, D, G, J). A hipokotil hosszmetszetek szövettani vizsgálata a *cbb1* és *cbb3* gyökérparenchima sejtjeinek erőteljes megnyúlását mutatta ki a BR kezelés hatására, míg kisebb mértékű elongációs hatás a vad típus esetében is megfigyelhető volt. A *cbb2* növényeknél ugyanakkor a 24-epikasztaszteron a hipokotil sejtek morfológiáját sem változtatta meg (16. ábra B, C, E, F, H, I, K, L).

A *cbb1* és *cbb3* növények esetében a 10 nM és 1 µM közti tartományban alkalmazott 24-epikasztaszteron kezelés koncentráció-függő módon hatott, míg a *cbb2* hipokotiljának hosszát nem befolyásolta (17. ábra). A biológiai tesztek szerint (Fujioka és mtsai, 1995b) a 24-epikasztaszteronnál aktívabb 24-epibrasszinolid hasonló mértékben hatott a *cbb3* növényekre DD körülmények közt, viszont kevésbé serkentette a *cbb1* mutáns növekedését, és a vad típusú csíranövényeknél már csökkent megnyúlást okozott (18. ábra). Ez a hatás összhangban áll az optimális feletti

BR koncentrációknál leírt növekedésgátló hatással (Clouse és mtsai, 1993), amely a gyökerek esetében már két nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációnál érvényesül.



17. ábra: 24-epikasztaszteron hatása a hipokotil-megnyúlásra fényben

Különböző koncentrációjú 24-epikasztaszteront tartalmazó MS médiumon, hosszúnappalos körülmények közt csíráztatott és nevelt 11 napos növények hipokotiljának hossza. Az adatok 50-50 mérés átlagai a szórás értékekkel.



18. ábra: 24-epibrasszinolid hatása a hipokotil-megnyúlásra sötétben Hormonmentes és 24-epibrasszinolidot tartalmazó MS médiumon, folyamatos sötétben csíráztatott és nevelt 11 napos növények hipokotiljának hossza. Az adatok 50-50 mérés átlagai a szórás értékekkel.



19. ábra: A *cbb* mutánsok jellemzése során használt szteroid vegyületek 1-3: Biológiai tesztekben aktív BR-ok; 4-11: egyéb természetes szteroidok.

A fenotipikus menekítő hatás specificitásának tisztázása végett megvizsgáltuk, hogy a cbb1 és cbb3 fenotípusát más szteroid vegyületek miként befolyásolják. Ezen kísérletek során (22S,23S)-homobrasszinolidot, 24-epibrasszinolidot (szintetikus BR származékok),  $\beta$ -szitoszterolt, sztigmaszterolt, sztigmasztanolt, sztigmasszta-2,24dien-3-ont (növényi membrán szterolok), ergoszterint (gomba szterol),  $\alpha$ - és  $\beta$ -ekdizont (rovar hormonok), valamint koleszterint használtunk (19. ábra) 0,1-1  $\mu$ M-os tartományban. Azt tapasztaltuk, hogy a *cbb1* és *cbb3* növényekben a fenotípus korrekcióját csak a három BR származékkal lehetett kiváltani, míg a többi szteroid vegyület hatástalan volt (nem bemutatott adatok). Ezek a tesztek azt mutatták, hogy a mutációk nem általában a szteroidok, hanem specifikusan BR-ok szintézisben okoznak zavart.

Annak megerősítésére, hogy a *cbb* mutációk alapvetően különböznek az Arabidopsis ismert, gibberellin-hiányos és -inszenzitív törpe mutánsaitól, megnéztük a BR kezelés hatását az utóbbiakra is. Bár a 0,5 µM 24-epibrasszinolid jelenlétében csíráztatott és nevelt gibberellin-deficiens *ga1-1*, *ga2-1*, *ga3-1*, *ga4-1* és *ga5-1*, valamint a gibberellinre érzéketlen *gai-1* mutánsok esetében mérsékelt hipokotilmegnyúlás volt tapasztalható, a levélnyelek és a levéllemez fejlődését a BR kezelés nem befolyásolta (20. ábra). Ezek a kísérletek igazolták, hogy a gibberellin és BR mutánsok törpesége független szignálátviteli utak működési hibáinak következményeként alakul ki.



20. ábra: BR kezelés hatása gibberellin-deficiens és -inszenzitív Arabidopsis mutánsokra

Az egyes képeken 11 napos gibberellin-deficiens (*ga1-1*, *ga2-1*, *ga3-1*, *ga4-1*, *ga5-1*) és -inszenzitív (*gai-1*) törpe mutánsok láthatók, amelyek hormonmentes (bal oldali növények), ill. 0,5 µM 24-epibrasszinolidot tartalmazó MS médiumon (jobb oldali növények), hosszúnappalos körülmények közt csíráztak és nőttek.

# 4.1.2.5. A cbb mutációk génexpressziós hatása

A menekítési kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a *cbb* mutánsok törpe fenotípusát a *cbb1* és *cbb3* növények BR-deficienciájának, illetve a *cbb2* BR-inszenzitivitásának hatására bekövetkező csökkent sejtmegnyúlás okozza. Ezért megvizsgáltuk a sejtfal fellazulásában és átrendeződésében fontos szerepet játszó xiloglikán-endotranszglikoziláz enzimcsalád tagjait kódoló *TCH4* (Braam és Davis, 1990) és a *MERI5* (Medford és mtsai, 1991) gének kifejeződését BR-mentes, ill. 0,5 µM 24-epibrasszinolidot tartalmazó MS médiumon nőtt kéthetes vad típusú és *cbb* csíranövényekben. Northern-hibridizációs analízissel a BR kezelés nélkül nevelt *cbb* mutánsokban a kezeltekénél, valamint a vad típusénál alacsonyabb *TCH4* és *MERI5* transzkriptumszintet lehetett kimutatni. A BR-hiányos *cbb1* és *cbb3* növényekben a 24-epibrasszinolid kezelés a kétféle mRNS akkumulációját eredményezte, míg a BR-ok érzékelésében sérült *cbb2*-nél a kezelt és kezeletlen mintákban a transzkriptumok mennyisége közel azonos volt (21. ábra A).



21. ábra: BR- és gibberellin-indukálható gének expressziója a *cbb* mutánsokban MS médiumon hosszúnappalos fényciklusban nevelt, kezeletlen (-), ill. BR-, vagy gibberellin-kezelt (+) háromhetes növények RNS mintáinak Northern-hibridizációs analízise. A növények a második hét végétől kerültek 0,5 μM 24-epibbrasszinolidot (A), vagy 1 μM GA<sub>3</sub>-at (B) tartalmazó táptalajra. Hibridizációs próbaként az *Arabidopsis TCH4* (At5g57560), *MERI5* (At4g30270) és *TIP1* (At2g36830) <sup>32</sup>P-jelölt cDNS-ét használtuk. Az autoradiogramok alatt mintafelviteli kontrollként a hibridizációs membránokhoz kötött, etidium-bromiddal festett RNS-ről készült felvételek láthatók.

Tekintettel arra, hogy a *MERI5* gén expressziója gibberellinel is indukálható, hasonló RNS-hibridizációs kísérlettel határoztuk meg, hogy mRNS-ének szintje a mutánsokban miként változik gibberellin kezelés hatására. GA<sub>3</sub> hozzáadásával a *MERI5* transzkriptum mennyisége mind a vad típusú, mind a mutáns növényekben növelhető volt, beleértve a *cbb2* vonalat is (21. ábra B). Meglepő módon a kontrollként használt, szintén gibberellin-indukálható *TIP1* génnél (Phillips és Hutty, 1994) a *cbb* mutánsokban a vad típushoz viszonyítva derepresszió volt megfigyelhető, ami a hormonindukálhatóság csökkenésével járt együtt (21. ábra B).

## 4.1.2.6. A BR-ok a fitohormonok önálló csoportjának tekinthetők

Az Arabidopsis néhány törpe mutánsáról tudott volt, hogy növekedési defektusuk oka gibberellin-deficiencia (Koornneef és van der Veen, 1980), gibberellinekkel (Koornneef és mtsai, 1985), vagy auxinokkal (Wilson és mtsai, 1990) szembeni inszenzitivitás, illetve az etilén szignálút konstitutív aktivitása (Kieber és mtsai, 1993). A fitohormonokkal és azok antagonistáival végzett kezelések eredményei, valamint a gibberellin-hiányos és -rezisztens vonalak BR reakciói alapján a *cbb* növények az ismert törpe mutánsokétól alapvetően különböző, önálló csoportot alkottak.

A *cpd*, *det2* és *cbb* mutánsok jellemzését követően rövidesen ismertté vált, hogy az *Arabidopsis*ból és más növényfajokból ismert törpe mutánsok jelentős része BR-hiányos (Nomura és mtsai, 1997; Azpiroz és mtsai, 1998; Klahre és mtsai, 1998; Bishop és mtsai, 1999), és hogy ezekéhez rendkívül hasonló fenotípust mutatnak a BR-ok érzékelésében sérült mutánsok is (Clouse és mtsai, 1996; Li JM és Chory, 1997). A BR-deficiens *Arabidopsis* vonalak törpe fenotípusának erőssége az egyes mutánsok esetében különböző. Bár a teljes funkcióvesztést okozó *dim1, det2, dwf4* és *cpd* mutációk más-más bioszintetikus funkciót inaktiválnak, GC-MS analízissel ezen vonalak mindegyikében kimutatható volt nyomokban az aktív BR formák jelenléte (Szekeres és Bishop, 2006), ami az érintett enzimek bizonyos fokú funkcionális redundanciájára utal. A *cpd* esetében ennek igen kis mértékét jelzi, hogy valamennyi mutáns közt ez mutatja a legextrémebb törpe fenotípust.

A cpd-hez hasonlóan a szintén súlyosan BR-hiányos det2, dim1 és dwf4 mutánsok esetében leírták azok de-etiolált/konstitutív fotomorfogenikus fenotípusát, amit sötétben az etiolációra jellemző megnyúlás és a sejtmagi fényregulált gének repressziójának hiánya mutat (Chory és mtsai, 1991; Azpiroz és mtsai, 1998). A jelenség alapos, a génexpressziós mintázatok összehasonlításán alapuló vizsgálata feltárta, hogy ezeknél a vonalaknál a fényszabályozás defektusa a det1, cop1 és cop9 mutánsokénál jóval kevesebb, főleg a csíranövény növekedését befolyásoló funkciót érint (Mayer és mtsai, 1996). A BR mutánsok esetében a fotomorfogenikus jelleg nem a fényszabályozás általános repressziójának zavarából, hanem a szabályozásban résztvevő hormonok megfelelő együttműködésének hiányából ered.

A *cbb1* és *cbb3* esetében a menekítési kísérletek nyilvánvalóvá tették, hogy ezekben a növényekben a BR bioszintézis sérült. A *cbb2* mutáció hatása jóval kevésbé volt egyértelmű. A fitohormon kezelések és a gibberellin-indukált génexpresszió vizsgálata során ezek a növények rendre a vad típuséhoz hasonló reakciókat mutattak, viszont BR kezelésre sem morfológiai változás, sem a BR-reszponzív *TCH4* és *MERI5* gének indukciója nem volt megfigyelhető. Mindezek egyértelműen arra utaltak, hogy a *cbb2* mutáció a BR szignálút valamelyik komponensének funkcióvesztését okozta.

A *cbb1* mutáció a későbbi vizsgálatok során izoallélikusnak bizonyult a *dwf1* (Feldmann és mtsai, 1989) és *dim1* (Takahashi T és mtsai, 1995) mutánsokkal, amelyek egy, a BR anyagcsereút kiindulópontjának számító kampeszterolt létrehozó, C-24 oxidatív izomerizációt katalizáló flavin-monooxigenáz génjét inaktiválják (Mushegian és Koonin, 1995). A *cbb1/dwf1-6* növények fenotípusa a *dwf1* és *dim1* mutánsokénál gyengébb, ami a *DWF1* gén részleges funkcióvesztésére utal. A BR-inszenzitív *bri1* mutáció által érintett, a BR receptort kódoló gén azonosítását (Li JM és Chory, 1997) követően a *cbb2* és *bri1* mutánsok allélikus viszonya is nyilvánvaló lett (Altmann, 1998). A *cbb2/bri1-2* mutáció teljes funkcióvesztést okoz, a homozigóta növényekben a *BRI1* mRNS nem kimutatható. A *cpd*-vel izoallélikus *cbb3/cpd-2* mutáció extrém törpeséget okoz, ami a CYP90A1 teljes, vagy közel teljes hiányára utal. A *cbb3/cpd-2* növényekben Northern-hibridizációval két *CPD*-vel homológ RNS forma detektálható, amelyek a vad típusra jellemző transzkriptumnál abundánsabbak, és nagyobb, ill. kisebb méretűek. Ennek alapján feltételezhető, hogy a mutánsban a *CPD* pre-mRNS valamelyik intronjának megfelelő kivágódása gátolt.

A BR-hiányos és -inszenzitív mutánsok a korábbiaknál sokkal ideálisabb objektumoknak bizonyultak a BR-ok génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A markáns törpe fenotípus alapján várható volt, hogy ezek a regulátorok elsősorban a sejtmegnyúlásban érintett gének kifejeződését szabályozzák. Kísérleteinkben BR kezelést követően erőteljesen felhalmozódtak a *MERI5* és *TCH4* mRNS-ek, amelyek a sejtmegnyúlás során a sejtfali cellulóz rostok átrendeződését katalizáló xiloglikánendotranszglikozilázokat kódolnak. Az egyetlen korábban ismert BR-indukálható gén, a szója (*Glycine max*) *BRU1* terméke szintén ebbe az enzimcsaládba tartozott (Zurek és Clouse, 1994). Az, hogy a *MERI5* kifejeződése BR-okkal és gibberellinekkel (Medford és mtsai, 1991) egyaránt indukálható összhangban áll azzal, hogy megnyúlási tesztekben ezen növekedés-szabályozók additív hatását észlelték (Mandava és mtsai, 1981; Gregory és Mandava, 1982). Több kutatócsoport nagy hatásfokú Affymetrix GeneChip cDNS-hibridizációs vizsgálatai alapján mára körvonalazódtak azok a sejtfunkciók, amelyek génjei preferáltan BR-szabályozottak (Goda és mtsai, 2002; Müssig és mtsai, 2002; Yin és mtsai, 2002). Ide tartoznak a sejtmegnyúláshoz, a celluláris vázelemek (pl. mikrotubulusok) kialakulásához szükséges enzimek, komponensek, és általánosságban az ismert szerepű BR-reszponzív gének mintegy fele transzkripciós regulátorokat kódol (Vert és mtsai, 2005). Jelentős átfedés látszik a BR- és auxinfüggő expresszió közt, amit jól illusztrál, hogy a gyökér fejlődésekor valamennyi auxin-regulált gén működését az aktív BR-ok szintje kontrollálja (Mouchel és mtsai, 2006).

A *cbb* mutánsok jellemzése idején BR-ok kereskedelmi forgalomban nem voltak elérhetők. Mivel a legáltalánosabban előforduló és biológiailag is legfontosabb BL és kongener származékainak (Suzuki H és mtsai, 1995) szintézise igen költséges volt, kísérleteinkben 24-epiBR vegyületeket használtunk. Bár pl. a 24-epibrasszinolid biológiai aktivitása a BL-éval összevethető (annak kb. 20%-a), és nyomokban néhány növényfajban kimutatható (Fujioka és Sakurai, 1997), a C-24 epimerek inkább szintetikus, nem pedig természetes BR formáknak tekintendők.

A *cpd, det2* és a *cbb* mutánsok vizsgálata feltárta a BR-ok fiziológiai hatásspektrumának leglényegesebb elemeit (Clouse, 1996a és 1996b). Ismertté vált, hogy a sejtmegnyúlás kontrollja mellett ezen vegyületeknek fontos szerepük van a fotomorfogenezis, szöveti differenciáció, stressz folyamatok, valamint a generatív szervek fejlődésének szabályozásában is. A súlyosan BR-deficiens vonalakban ez utóbbi hatás egyrészt a virágzás késleltetésében nyilvánul meg, részben pedig abban, hogy a pollentömlő kialakulásának zavara miatt ezek a növények gyakorlatilag hímsterilek. Ezek alapján az eredmények alapján merült fel, hogy a korábban csupán növekedésszabályozónak tekintett BR-ok valódi fitohormonoknak tekinthetők, hiszen megfelelnek az ezek definíciójában szereplő két fő kritériumoknak: valamennyi virágos növényben előfordulnak, és a normális egyedfejlődési ciklus biztosításához nélkülözhetetlenek (Clouse, 1996b; Hooley, 1996; Russell, 1996). Az egyre intenzívebb kutatások ezután rövid időn belül megerősítették és általánosan elfogadottá tették, hogy a BR-ok valóban a növényi hormonok újabb, önálló csoportját alkotják (Yokota, 1997; Clouse és Sasse, 1998).

#### 4.2. A BR-bioszintetikus P450 gének szabályozása

#### 4.2.1. A CPD gén BR-függő kifejeződése

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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]

Korábbi vizsgálataink alapján ismert volt, hogy a *CPD* gén a BR bioszintézis egy fontos korai lépését katalizáló enzimet kódol, és hogy funkcióvesztése extrém törpe fenotípust eredményez. Ennek alapján feltételezhető volt, hogy a *CPD* expresszió szabályozása meghatározhatja a BR szintézis hatékonyságát, és ezáltal a hormonszint alakulását is.

Munkánk célja a *CPD* gén expressziós tulajdonságainak, és az azt befolyásoló tényezőknek a megismerése volt. Részletesen jellemezni kívántuk emellett a kifejeződés szervspecificitását, és azt is, hogy ez miként viszonyul az egyes növényi részek differenciált BR igényéhez.

## 4.2.1.1. A CPD gén aktivitása BL-dal represszálható

A tervezett expressziós vizsgálatokhoz izoláltuk a *CPD* gén promóterének és 5' nem kódoló részének a transzlációs starthelyig terjedő 965 bp-os szakaszát, és a pPCV812 bináris vektorban fuzionáltattuk a *GUS* (*E. coli uidA*) riportergénnel. A fúziót *Agrobacterium*-mediált transzformációval *Arabidopsis* (Col-0) növénybe juttatva stabil transzgenikus vonalat hoztunk létre. Northern-hibridizációs eredményeink szerint a transzformált vonalban a génfúzió 965 bp-os és a növény endogén *CPD* promótere egyező kifeleződési szintet és szabályozást biztosított (23. ábra).

Annak megállapítása céljából, hogy a BR-okkal vélhetően összehangoltan ható fitohormonok miként befolyásolhatják a *CPD* transzkripcióját, megvizsgáltuk a csíranövényekben a riportergén által termelt β-glukuronidáz aktivitás változását 1 µM auxinnal (indol-3-ecetsav és α-naftilecetsav), gibberellinnel (gibberellinsav, GA<sub>3</sub>), és citokininnel (6-benzil-aminopurin) végzett kezelést követően. Ezek a hormonok spektrofluorimetriás méréseink szerint a riporter aktivitását érdemben nem módosították (22. ábra C), és hasonlóan hatástalannak bizonyultak a metil-jazmonáttal, szalicilsavval, az etilén-prekurzor 1-amino-cikloprpán-1-karboxilsavval (ACC) és ergoszterinnel (nem BR szteroid kontroll) végzett kezelések is (valamennyi 1 µM; nem bemutatott adatok). Igen hatékonyan gátolható volt viszont a GUS expresszió 1 µM BL-
dal, ami a mért β-glukuronidáz aktivitást a kontroll szintjének kevesebb, mint 10%-ára csökkentette (22. ábra B, C). Részletesebb mérésekkel kimutatható volt e hatás koncentráció-függő jellege, melynek során már 1 nM BL-dal erős (mintegy 50%-os), 100 nM-lal pedig maximális repressziót lehetett kiváltani (22. ábra A).



22. ábra: Fitohormonok hatása a *CPD* promóter aktivitására *CPD:GUS* csíranövények nyolcnapos korig csíráztak és nőttek LD fényciklus mellett hormonmentes (ktr), vagy fitohormont tartalmazó MS médiumon. A kezelt minták táptalajait (A) különböző koncentrációjú BL-ot, (B) BL bioszintézis intermediereket (CR: kampeszterol, CN: kampesztanol, CT: kataszteron, TE: teaszteron, DT: 3dehidroteaszteron, TY: tifaszterol, CS: kasztaszteron, BL: brasszinolid; mindegyik 1  $\mu$ M), vagy (C) 1  $\mu$ M BL-ot, indol-3-ecetsavat (IAA),  $\alpha$ -naftilecetsavat (NAA), gibberellinsavat (GA), ill. 6-benzil-aminopurint (BAP) tartalmaztak. A relatív  $\beta$ glukuronidáz aktivitásokat 20-20 csíranövény sejtmentes extraktumából határoztuk meg spekrofluorimetriás módszerrel. A grafikonokon három független kísérlet adatainak átlagai és a szórás értékek láthatók.

### 4.2.1.2. A CPD BR repressziója de novo fehérjeszintézist igényel

A *CPD:GUS* fúzió kifejeződésének BL gátlása transzkripciós szintű regulációra utalt, ezért megvizsgáltuk, hogy miként változik a transzgénről átíródó mRNS stacioner szintje a kezelés hatására. A kísérletben a *CPD:GUS* transzgenikus csíranövények médiumát - cikloheximid fehérjeszintézis-gátlóval történt előkezeléssel, vagy anélkül - BL-dal egészítettük ki. A kontroll növényeket azonos körülmények közt BL nélkül, illetve csak cikloheximidet tartalmazó tápfolyadékban inkubáltuk. A hormonkezelést közvetlenül megelőzően (0 időpont), majd 2, 4, valamint 6 óra elteltével leszedett növényekből készített RNS mintákban Northern-hibridizációval határoztuk meg az endogén *CPD*, valamint a transzgén eredetű *GUS* mRNS-ek relatív mennyiségeit.



23. ábra: Az endogén CPD és a CPD promóter által vezérelt GUS riporter BR-regulált transzkripciója

Nyolcnapos, LD (A és C), ill. DD (B és D) körülmények közt nevelt csíranövényeket MS tápfolyadékba helyeztünk, és változatlan fényviszonyok mellett a kezeletlen (ktr), cikloheximiddel (CHX), cikloheximid + BL-dal (CHX+B), vagy csak BL-dal (BL) kezelt párhuzamos kultúrákból kétóránként mintát vettünk, majd ezekből RNS-t izoláltunk. A kísérletben a 0 időpont a BL (1 µM) kezelés kezdete, a cikloheximidet (100 µM) pedig ezt megelőzően 30 perccel adtuk a megfelelő kultúrákhoz. Az autoradiogramok a *CPD* (A és B), ill. *GUS* (C és D) cDNS próbákkal kapott Northern-hibridizációs mintázatot mutatják, az alattuk levő grafikonokon pedig a detektált transzkriptumoknak a kezetlen kontrollok 0 időpontban mért értékéhez (100%) viszonyított mennyiségei láthatók.

Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a LD ciklusban nevelt csíranövényekben a *CPD* transzkriptum szintje a BL kezelést követő két órán belül a kezeletlen kontrollénak kb. 10%-ára esett vissza, és az ezt követő inkubáció során már alig változott. Igen hasonló, bár valamivel lassabb csökkenés volt tapasztalható a folyamatos sötétben (DD) nevelt és kezelt mintában is. Cikloheximid hatására a *CPD* mRNS mennyisége a

LD és DD csíranövényekben egyaránt egyenletesen, nagyjából kétórás felezési idővel csökkent, a BL jelenlététől vagy hiányától függetlenül (23. ábra A, B). A LD és DD növények RNS mintái *CPD* transzkriptuméhoz igen hasonló hibridizációs mintázatot adtak a *CPD* promóter vezérelte riporter detektálására alkalmas *GUS* próbával is (23. ábra C, D). Ezek az adatok azt mutatták, hogy a *CPD* gén BR szabályozottsága alapvetően a promóter régió által meghatározott, tehát elsődlegesen a transzkripció szintjén érvényesül. Másrészt nyilvánvalóvá vált, hogy ez a regulációs folyamat cikloheximiddel gátolható, tehát kialakulása *de novo* fehérjeszintézist igényel.

# 4.2.1.3. A CPD expresszió fejlődés- és szervspecifikus szabályozása

Korábbi eredményeink a *CPD* mRNS differenciált eloszlását mutatták az egyes szervekben (9. ábra B), ezért a *CPD:GUS* transzgenikus vonal felhasználásával részletesebben is megvizsgáltuk a *CPD* promóter aktivitását az egyedfejlődés során. Erre a célra GUS hisztokémiai festést alkalmaztunk, amely a színtelen X-gluc szubsztrátból a glukuronidáz hatására termelődő indigó színezék révén lehetőséget adott a transzgén kifejeződésének pontos lokalizálására.

Az MS táptalajon LD körülmények közt nevelt növényeknél a GUS aktivitás először a csírázás kezdetétől számított harmadik napon volt észlelhető. A sziklevelekre korlátozódó festődés a nyolcadik napig folyamatosan erősödött, és a 12. napon a megjelenő levélkezdeményekben is jelen volt (24. ábra B). Nagyon hasonló kifejeződési mintázatot kaptunk a DD viszonyok mellett nevelt magoncokban is, amelyeknél a festődés - valószínűleg részben az etiolált sziklevelek kompaktabb szerkezete miatt is - valamivel erősebb volt, és esetenként kiterjedt a hipokotil legfelső részére is (24. ábra A). Azoknál a LD csíranövényeknél, amelyek 1 μM BL-ot tartalmazó médiumon csíráztak és nőttek, a GUS kifejeződés erősen represszált volt, és csak a 12 nap után, a valódi levelek kezdeményeiben vált jól detektálhatóvá (24. ábra B).

A GUS festődés az egyedfejlődés későbbi stádiumaiban jól kimutatható volt a tőlevelek levéllemezeiben, de igen alacsony szintű volt a levélnyelekben és a gyökérzetben. Erős transzgén aktivitás elsősorban a fejlődő levelekben volt megfigyelhető, a kifejlett levelekben viszont idővel azok marginális részére, majd erezetére szorult vissza (25. ábra A). A leveleken belül az expresszió főleg a felső mezofill régió oszlopos parenchima rétegében, valamint a felszíni epidermisz



24. ábra: A *CPD* promóter aktiválódása a csíranövények fejlődése során DD (A) és LD (B) viszonyok mellett csíráztatott és nevelt, 1, 3, 5, 8 és 12 napos *CPD:GUS* növények GUS hisztokémiai festődése. A B panel alsó képsorán látható csíranövények médiuma 1 μM BL-ot tartalmazott.

gázcserenyílásainak zárósejtjeiben volt erős (25. ábra B, C). A virágzatban a fellevelek és a csészelevelek mutattak GUS festődést (25. ábra D, E), a szik- és tőlevelekhez hasonlóan ezek is elsősorban kialakulásuk időszakában.

# 4.2.1.4. A BR bioszintézis intermediereinek regulációs hatása

Kísérleteinkben a *CPD* expresszióját a BR-ok hatékonyan és specifikusan gátolták, ezért várható volt, hogy a kifejeződés mértéke alkalmas lehet a BR-ok biológiai aktivitásának megbízható biológiai tesztelésére. Tekintettel arra, hogy az ismert természetes és szintetikus BR-ok élettani hatékonyságáról publikált adatokat





MS táptalajon LD fényciklusban nevelt négyhetes *CPD:GUS* növények tőleveleinek és gyökérzetének (A), levele keresztmetszetének (B) és felszíni epidermiszének (C), valamint virágainak és felleveleinek (D, E) GUS hisztokémiai festődése.

különböző biológiai tesztek segítségével nyerték, értékes információt szolgáltathatott a rendelkezésünkre álló BR származékok *CPD* expresszióra gyakorolt hatásának összehasonlítása.

Az tesztekhez olyan sötétben nevelt nyolcnapos *CPD:GUS* csíranövényeket használtunk, melyek médiumai az egyes BR-okat, ill. közvetlen prekurzoraikat 1 μM koncentrációban tartalmazták. A növényi minták sejtmentes kivonataiban a β-glukuronidáz specifikus aktivitást spektrofluorimetriás módszerrel határoztuk meg (26.



26. ábra: BR származékok gátló hatása a *CPD* promóter aktivitására DD körülmények közt BR-mentes (MS), vagy a 27. ábrán szereplő BR-okat 1 μM koncentrációban tartalmazó táptalajon nevelt nyolcnapos csíranövények (mintánként 20) sejtmentes kivonatainak a 4-metil-umbelliferon (MU) termék alapján meghatározott specifikus β-glukuronidáz aktivitása. Az ábrán 3-3 párhuzamos minta spektrofluorimetriás adataiból kalkulált átlagértékek láthatók.

ábra). A kísérletben a felhasznált vegyületek (27. ábra) közül a BL szintézisút kiindulópontjául szolgáló kampeszterol, az ennek redukciójával létrejövő kampesztanol, valamint a korai intermedier teaszteron C-24 epimerje a *CPD* expressziót nem befolyásolta, a többi származék viszont különböző mértékű gátlást eredményezett. E tekintetben leghatékonyabbnak a BL, a prekurzorának számító kasztaszteron, valamint ezekkel megegyező oxidáltsági fokú BR származékok bizonyultak (26. ábra).



27. ábra: A génexpressziós vizsgálatok során használt szteroidok A: A BL bioszintézis anyagcsereút (Choi és mtsai, 1997) vegyületei. Az enzimatikus reakciókat a korai C-6 oxidációs ágnál sötét, míg a későinél világos nyilak (több lépés esetén kettős nyilak) jelölik. B: A kísérletekben használt egyéb szteroid és BR származékok.

# 4.2.1.5. A CPD expresszió és a BR bioszintézis kapcsolata

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a *CPD* gén fontos szerepet játszik a BR bioszintézisben, ezért szabályozottságának tanulmányozására olyan stabil transzformáns növényt hoztunk létre, amelyben a *GUS* riportergén a *CPD* promóter kontrollja alatt fejeződik ki. A *CPD:GUS* vonal felhasználásával nyerhető adatok megbízhatóságát jelezte, hogy bennük az endogén kópiáról származó *CPD* és a transzgén eredetű *GUS* mRNS-ek azonos módon expresszálódtak. A riporter GUS/β-

glukuronidáz könnyen detektálható és lokalizálható volt, bár eredményeink értékelésénél figyelembe kellett vennünk, hogy aktivitása a transzkripció változásait, és - közel 50 órás fél-életideje (Jefferson és mtsai, 1987) miatt - főként annak csökkenését jelentős késéssel követheti. Kísérleteinkben intenzív *CPD* kifejeződést elsősorban a differenciálódó és intenzíven növekvő levelekben, virágkezdeményekben, valamint etiolált csíranövényeknél a hipokotil felső, megnyúlási részén észleltünk.

A BR szintézisnek a *CPD* gén expresszióján keresztüli szabályozottságát jelezte a transzkripciós aktivitás BR-ok általi szabályozása is. Ilyen, a szintézisút végén létrejövő bioaktív termék szintjétől függő negatív visszacsatolásos szabályozás több fitohormon esetében is ismert, és fontos szerepet játszik fiziológiailag optimális koncentrációjuk fenntartásában. Hasonló homeosztatikus mechanizmusok kontrollálják az aktív hormonszintet például az etilén (Nakatsuka és mtsai, 1998), az auxinok (Ljung és mtsai, 2001) és a gibberellinek (Phillips és mtsai, 1995) esetében is. Utóbbiak esetében a visszacsatolásos reguláció a *CPD* généhez rendkívül hasonlóan, a bioszintézis két utolsó enzimét kódoló gének transzkripciós gátlásán keresztül valósul meg (Yamaguchi és Kamiya, 2000).

Az, hogy a BR-oknak a *CPD* kifejeződésre gyakorolt hatása cikloheximiddel gátolható azt jelezte, hogy a represszióért felelős protein faktorok valamelyike a hormon hatására termelődik. Jelenlegi ismereteink szerint az expresszió csökkenését a BZR1 represszornak a *CPD* promóter specifikus kötőhelyéhez való kapcsolódása okozza (He és mtsai, 2005). A BZR1 komplex szabályozás alatt áll, aktivitásához sejtmagi transzportra, és a natív formában foszforilált, gyorsan lebomló fehérje defoszforiláció általi stabilizációjára van szükség (Wang és mtsai, 2002). Legvalószínűbbnek az tűnik, hogy a fehérjeszintézis gátlása az instabil sejtmagi BSU1 foszfatáz (Mora-Garcia és mtsai, 2004) újratermelődését akadályozva vezethet a foszforilált BZR1-nek a 26S proteoszómán keresztüli lebomlásához, és ezáltal transzkripciós szabályozó szerepének megszűnéséhez (Li JM és Jin, 2007).

A *CPD* BR-indukált repressziója olyan specifikus molekuláris hatás volt, ami az egyes BR származékok aktivitásának sokkal megbízhatóbb indikátorának ígérkezett, mint a korábban kifejlesztett, morfológiai hatásokon alapuló tesztek. Az általánosan használt, a bab második internódiumának felhasadásán (Mitchell és Livingston, 1968), vagy a rizs lamina-elhajlásán (Wada és Marumo, 1981) alapuló módszerekkel kapott eredményeket ugyanis más hormonok, főként az auxinok befolyásolták (Cao H és Chen, 1995). Ezzel szemben a *CPD* expresszióra gyakorolt hatás specifikus volt,

nagyságrendi változást eredményezett, és már 1 nM koncentrációjú BL kimutatását lehetővé tette.

Kísérleteinkben a kampeszterolból kiinduló (C<sub>28</sub>) BL szintézisút intermedierei (27. ábra A) mellett olyan származékoknak a *CPD* aktivitást represszáló hatását is teszteltük, amelyek párhuzamosan ágak mentén koleszterinből (C<sub>27</sub>), szitoszterolból és izofukoszterolból (mindkettő C<sub>29</sub>) kiindulva keletkeznek. A végtermék 28-norbrasszinolid, 28-homobrasszinolid, ill. 28-homodolicholid kongener származékai (27. ábra B) számos növényfajban kimutathatók, de a BL út képviselőihez viszonyítva mennyiségük, és feltehetően fiziológiai szerepük is alárendelt (Yokota, 1997). A 24-epiBR származékok szintetikus formák, amelyek növényekben valószínűleg csak melléktermékekként fordulnak elő. Tesztünk azt mutatta, hogy a vizsgált vegyületek hatékonysága jól korrelált oxidáltságuk, a hidroxi-, oxo- és lakton-csoportok jelenlétének mértékével (26. ábra). A *CPD* aktivitás represszióján alapuló eredmények jó egyezést mutattak a funkcionalitás azon strukturális kritériumaival, amelyeket főként a rizs lamina teszt alapján lehetett meghatározni (Brosa és mtsai, 1996).

Bár a vizsgált származékok túlnyomó többsége gátolta a *CPD* kifejeződését, feltételezhető volt, hogy legtöbbjük nem rendelkezik tényleges biológiai aktivitással, és hatásuk a bioszintetikus útba belépve, közvetetten érvényesül. Így tesztünkben a biológiai hatékonyságban mutatkozó eltérések a vegyületek felvételének és az átalakulás hatékonyságának különbségeiből eredhettek. Ez a magyarázat összhangban áll azzal, hogy rendre a jobb vízoldékonyságú, és a szintézisútban a BL-hoz (vagy C<sub>27</sub> ill. C<sub>29</sub> megfelelőihez) közelebb álló intermedierek bizonyultak effektívebbnek. Azóta további bioszintetikus mutánsok tanulmányozása (Nomura és mtsai, 2005) és direkt, receptorkötési vizsgálatok (Kinoshita és mtsai, 2005) alapján is tudható, hogy az élettanilag jelentős C<sub>28</sub> vázú BR-ok közül tényleges biológiai aktivitással kizárólag a szintézisút utolsó enzime által termelt BL, és a nála valamivel kevésbé hatékony kasztaszteron rendelkezik.

Eredményeink azt mutatták, hogy a *CPD* gén összetett transzkripciós szabályozás alatt áll, és hogy ennek szerepe van a BR háztartás kiegyensúlyozásában. Mivel a BR-ok a megnyúlási és differenciációs folyamatok fontos regulátorai (Clouse, 1996b), az elsősorban a fejlődő szervekre és bizonyos (főleg fotoszintetikusan aktív) sejttípusokban megfigyelt *CPD* aktivitás a BR szintézis és hatás helyeinek egybeesésére, és lehetséges fényszabályozottságára utalt. Bár e bioszintetikus gén működése a BR szabályozást csak áttételesen, a CYP90A1 monooxigenáz szintjén, a BR szintézis egészén, a hormon felhalmozódás mértékén és

annak élettani hatékonyságán keresztül befolyásolhatja, negatív visszacsatolásos reguláltsága azt jelzi, hogy ez a hatás jelentős lehet.

#### 4.2.2. Az Arabidopsis BR-bioszintetikus P450 génjeinek expressziója

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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]

Röviddel a *CPD* jellemzését követően az *Arabidopsis* BR bioszintézisének további génjeit, funkcióit is azonosították. A *DWF4* által kódolt CYP90B1-ről kimutatták, hogy a szteroid oldallánc C-22-es pozíciójának hidroxilációjáért felelős (Choe és mtsai, 1998), a paradicsom *Dwarf* génnel való homológiája alapján felismert *CYP85A1* esetében pedig *in vitro* is igazolható volt termékének C-6 oxidáz aktivitása (Shimada és mtsai, 2001). Ismertté váltak továbbá a *rotundifolia 3 (rot3)* mutáns segítségével azonosított *CYP90C1* (Kim GT és mtsai, 1998), és az *Arabidopsis* genom közzétételével (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) elérhető *CYP85A2* és *CYP90D1* gének is. Bár ezek funkciója ismeretlen volt, a CYP85, valamint CYP90 családokhoz való tartozásuk arra utalt, hogy szintén a BR bioszintézisben lehet szerepük.

Munkánk célja a CYP85 és CYP90 enzimek és génjeik strukturális és funkcionális rokonsági viszonyainak felderítése volt. Meg akartuk vizsgálni esetleges BR szinttől függő szabályozottságukat, ill. annak specifikus vagy kiterjedtebb voltát, összehangoltságát. Tisztázni kívántuk továbbá a BR szintézis korai, ill. késői reakcióit katalizáló P450-ek génjeinek szervspecifikus kifeleződését, ennek lehetséges hatását a BR tartalom növényen belüli eloszlására.

### 4.2.2.1. A BR bioszintézisben résztvevő P450 gének evolúciós rokonsága

Röviddel a *CPD*-t követően az *Arabidopsis* BR bioszintézisének további génjeit, funkcióit is azonosították. A *DWF4* által kódolt CYP90B1-ről kimutatták, hogy a szteroid oldallánc C-22-es pozíciójának hidroxilációjáért felelős (Choe és mtsai, 1998), a paradicsom *Dwarf* génnel való homológiája alapján felismert *CYP85A1* esetében pedig *in vitro* is igazolható volt termékének C-6 oxidáz aktivitása (Shimada és mtsai, 2001). Ismertté váltak továbbá a *rotundifolia 3* (*rot3*) mutáns segítségével azonosított



CYP90C1 (Kim GT és mtsai, 1998), és az Arabidopsis genom közzétételével (The

28. ábra: Az Arabidopsis BR-bioszintetikus P450 enzimeinek rokonsági viszonyai Az aminosav-szekvenciákból származtatott filogram a BR bioszintézisben résztvevő (vastagbetűvel kiemelt) CYP85A1 (At5g38970), CYP85A2 (At3g30180), CYP90A1 (At5g05690), CYP90B1 (At3g50660), CYP90C1 (At4g36380) és CYP90D1 (At3g13730), az ezekkel nagymértékben homológ, a gibberellin anyagcsereútban szereplő ent-kaurénsav oxidázok (CYP88A3/KAO1, At1g05160 és CYP88A4/KAO2, At2g32440) valamint két, a BR-ok inaktivációjáért felelős P450 (CYP72C1/CHIBI2, At1g17060 és CYP734A1/BAS1, At2g26710) rokonsági kapcsolatát mutatja. Ha van ilyen, az enzimek CYP megjelölései mellett genetikai szimbólumaikat is feltüntettük. Zárójelben az egyes szekvenciáknak a CYP90A1-ével való %-os egyezése szerepel.

Arabidopsis Genome Initiative, 2000) elérhető CYP85A2 és CYP90D1 gének is. Bár ezek funkciója ismeretlen volt, a CYP85, valamint CYP90 családokhoz való tartozásuk arra utalt, hogy szintén a BR bioszintézisben lehet szerepük.

A megismert BR-bioszintetikus P450 enzimek valamennyien a CYP85 és CYP90 családokba tartoztak. Aminosav-szekvenciáikat BLAST homológia analízissel (Altschul és mtsai, 1990) összehasonlítva a két P450 család tagjai egymás legközelebbi rokonainak bizonyultak, és igen közel álltak a gibberellin bioszintézisben résztvevő két, CYP88 családba tartozó enzimhez is (Helliwell és mtsai, 2001). Ezzel szemben csak igen kismértékű homológiát mutattak a CYP72C1 (Nagatani és mtsai, 1998) és CYP734A1 (eredetileg CYP72B1; Neff és mtsai, 1999) monooxigenázokkal, amelyeknek a BR-ok inaktiválásában tulajdonítottak szerepet. Az említett P450-ek rokonsági kapcsolatait bemutató, aminosav-szekvenciáikból ClustalW többszörös illesztéssel (Thompson és mtsai, 1994) kapott filogram a 28. ábrán látható.



29. ábra: Az Arabidopsis BR-bioszintetikus P450 gének struktúrájának összehasonlítása

A 28. ábrán szereplő P450 enzimeket kódoló gének exon/intron szerkezete. Az exonokat jelölő téglalapokban a számok azok nukleotidákban kifejezett hosszát adják meg.

Az aminosav-szekvenciákéhoz hasonlóan nagyfokú hasonlóság mutatkozott a *CYP85* és *CYP90* gének szerkezetében is. Ezeknél, valamint a CYP88 géneknél is a kódoló régió 9 exon alapelemből épült fel, amelyek közt az intronok konzervált pozíciókban helyezkedtek el, míg a velük csak csekély mértékben homológ *CYP72C1* és *CYP734A1* gének ettől eltérő exon-intron struktúrával rendelkeznek (29. ábra). A gének felépítésében és a kódolt fehérjék primér szerkezetében megmutatkozó egyezések alapján felismerhető volt a CYP85 és CYP90 családok közeli evolúciós kapcsolata, és az, hogy időbeni szétválásuk már a BR-specifikus működés kialakulását követően történt.

# 4.2.2.2. A CYP85 és CYP90 gének negatív visszacsatolásos kontrollja

Ismert volt, hogy a BR szintézis végtermékeként keletkező BL gátolja a CYP90A1-et kódoló CPD transzkripcióját. Annak felderítésére, hogy más BR-

bioszintetikus génekre is kiterjed-e ez a negatív visszacsatolásos szabályozás, megvizsgáltuk a CYP85A1, CYP85A2, CYP90B1, CYP90C1 és CYP90D1 mRNS-ek mennyiségének alakulását BL kezelés hatására. Tekintettel arra, hogy ezen transzkriptumok fiziológiás szintje a CPD-énél általában nagyságrenddel alacsonyabb (Choe és mtsai, 1998; Shimada és mtsai, 2001), a megbízható detektálás érdekében ezeket az analíziseket Northern-hibridizáció helyett félkvantitatív RT-PCR módszerrel végeztük. Ezek során azt tapasztaltuk, hogy 100 nM BL harására valamennyi CYP85 és CYP90 mRNS szintje a CPD-éhez hasonlóan a kezeletlen kontrollénak mintegy 10%-ára csökkent (30. ábra A), jelezve, hogy a BR bioszintézis valamennyi P450 enzimének kifejeződése egységesen végtermékfüggő negatív transzkripciós szabályozás alatt áll.



30. ábra: BL kezelés hatása a *CYP85* és *CYP90* transzkriptumok szintjére Egyhetes LD ciklusban nevelt csíranövényeket 4 órán át inkubáltunk hormonmentes (ktr), vagy 100 nM BL-ot (BL) tartalmazó MS tápoldatban. Az autoradiogramokon a vad típusú Col-0 (A), BR-deficiens *cpd* és *cbb3* (B), valamint BR-inszenzitív *cbb2* (C) növényekből izolált RNS mintákkal és génspecifikus primerekkel (3. táblázat) végzett RT-PCR reakciók <sup>32</sup>P-jelölt termékei láthatók. Konstitutív kontrollként az ugyanezen RNS mintákkal végzett *UBQ10* reakciók termékei szerepelnek. Az alkalmazott PCR ciklusszám 15 (*UBQ10*), 20 (*CPD*), ill. 25 (*CYP85A1*, *CYP85A2*, *DWF4*, *ROT3*, *CYP90D1*) volt.

A visszacsatolásos szabályozottság miatt várható volt, hogy a *CYP85* és *CYP90* gének a BR-deficiens és -inszenzitív mutánsokban a vad típushoz viszonyítva magasabb szinten expresszálódnak. Eredményeink ellenőrzésére ezért megnéztük

stacioner transzkriptumszintjüket, valamint azok BL-függő alakulását BR-hiányos *cpd* és *cbb3*, valamint BR-inszenzitív *cbb2* növényekben is. (Mivel *CPD* mRNS a *cpd* mutánsban nem detektálható, ennek vizsgálatához az egyébként azonos fenotípusú *cbb3* vonalat kellett használnunk.) Az RT-PCR termékek alapján a hormonhiányos mutánsokban a *CYP85* és *CYP90* transzkriptumok a vad típusénál nagyobb mennyiségben voltak jelen, BL kezelést követően viszont szintjük hasonló mértékben csökkent (30. ábra B). A *cbb3* mutánséhoz hasonlóan erős *CPD* kifejeződést tapasztaltunk a BR-inszenzitív *cbb2* vonalban is, ez viszont BL kezelés után is változatlan maradt (30. ábra C).

### 4.2.2.3. A CYP85 és CYP90 mRNS-szintek változása a csírázás folyamán

A BR-bioszintetikus gének működésének jobb megismerése végett RT-PCR analízissel meghatároztuk a *CYP85* és *CYP90* transzkriptumok mennyiségének alakulását a csírázás kezdetétől számított nyolcadik, valamint a 14. napon. A legkorábban megjelenő CYP85A2 és ROT3 mRNS-ek már a csírázás első napjától



31. ábra: A CYP85 és CYP90 mRNS-ek mennyiségi változásai a csírázás és korai fejlődés során

Az RT-PCR reakciókat a 30. ábrán leírtak szerint végeztük LD viszonyok mellett nevelt, a csírázás kezdetétől számítva 1-8, ill. 14 napos csíranövényekből preparált RNS mintákkal. A <sup>32</sup>P beépülés alapján kalkulált kvantitatív adatokat a kísérlet során mért maximum értékek százalékaként ábrázoltuk.

kimutathatók voltak. Az első hét folyamán mindegyik transzkriptum esetében tranziens felhalmozódást tapasztaltunk, bár ezek mértéke és időbeni maximuma különböző volt. A legerősebb expressziót követően - a viszonylag magas szinten kifejeződő *CPD* kivételével - valamennyi mRNS abundanciája csökkent és a második hét végére a maximum értékek 10%-a körül, vagy az alatt stabilizálódott (31. ábra).

# 4.2.2.4. A transzkriptumok differenciált szervspecifikus felhalmozódása

Korábban azt tapasztaltuk, hogy a *CPD* gén preferáltan a zöld, fotoszintetizáló szervekben fejeződik ki. Annak tisztázására, hogy hasonlóan szabályozott-e a többi BR-bioszintetikus gén aktivitása, RT-PCR segítségével meghatároztuk transzkriptumaik mennyiségi eloszlását egyhetes zöld csíranövények hajtásaiban (levelek, sziklevelek és hipokotil) valamint gyökérzetében. Eredményeink azt mutatták, hogy bár a hajtás- és gyökérmintában vizsgált mRNS-ek többsége nem egyenletesen oszlik meg (32. ábra A), a *CPD*-éhez hasonló, hajtásspecifikus felhalmozódást csak *CYP85A2* esetében tapasztaltunk. A P450-eket kódoló mRNS-ek egy másik csoportja (*ROT3, CYP90D1*) a gyökérzetben volt abundánsabb, míg a *DWF4* a hajtásban és



32. ábra: A BR-bioszintetikus mRNS-ek eloszlása csíranövények hajtásaiban és gyökereiben

Egyhetes, LD ciklusban nőtt vad típusú (A), ill. BR-inszenzitív *cbb2* (B) csíranövények hajtás (H) és gyökér (Gy) részeiből, valamint vad típusú, kezeletlen (ktr) és 4 órán át 100 nM BL-dal kezelt (BL) csíranövények gyökereiből (C) készült RNS-ekkel végzett RT-PCR termékeinek autoradiogramjai. A PCR reakciók körülményei azonosak voltak a 30. ábránál leírtakkal.

transzkriptum	7 napos Arabidopsis	20 napos Arabidopsis
CYP85A1	0,26	0,60
CYP85A2	12,12	8,66
CPD/CYP90A1	8,33	3,23
DWF4/CYP90B1	0,95	1,09
ROT3/CYP90C1	0,31	0,32
CYP90D1	0,32	0,28
DIM1	1,02	0,98
DET2	0,90	0,95

### 5. táblázat: A BR-bioszintetikus gének tanszkriptumainak hajtás/gyökér aránya

gyökerekben nagyjából egyformán volt reprezentálva. Egyenletes eloszlásúnak bizonyult két, korai reakciókat katalizáló, nem P450 típusú enzimhez tartozó transzkriptum (*DIM1*, *DET2*) is. Ugyanezen transzkriptumok hasonló megoszlását tapasztaltuk húsznapos növények hajtásaiban és gyökereiben is (5. táblázat). Az idősebb növényekben kisebb szervspecifikus különbségek voltak észlelhetők, ami valószínűleg a BR-bioszintetikus gének ekkorra erősen lecsökkent expressziójából következett.

Annak tisztázására, hogy a *CPD* mRNS hajtásspecifikus felhalmozódásában szerepet játszik-e a BR-reguláció, meghatároztuk mennyiségét BR-inszenzitív *cbb2* csíranövények hajtás- és gyökérrészeiben is. A BRI1 BR receptor nélküli mutánsban a *CPD* transzkriptum eloszlása a vad típuséhoz hasonló volt (32. ábra B). Emellett a gyökérzet alacsonyabb mRNS-szintjét BL kezeléssel tovább lehetett csökkenteni (32. ábra C). Ezek az adatok egyértelműen azt mutatták, hogy a végtermék-visszacsatolásos szabályozás működéséhez a BR szignálátviteli út intaktsága

szükséges, és hogy az expresszió szervpecificitásának és BR-függésének regulációs folyamatai egymástól függetlenek.

# 4.2.2.5. Az endogén BR-ok szervspecifikus eloszlása

A CYP85 és CYP90 mRNS-ek differenciált felhalmozódása a hajtásban és gyökérzetben a BR szintézis szabályozásának eltérő voltára utalt a földalatti, ill. földfeletti szervekben. Ennek felderítésére kvantitatív GC-MS analízissel meghatároztuk húsznapos Arabidopsis növények hajtás és gyökér részeinek endogén BR tartalmát. Továbbá összehasonlítás végett ugyanezt a vizsgálatot elvégeztük két másik kétszikű faj, a borsó (P. sativum, cv. Torsdag), és paradicsom (S. lycopersicum cv. Sekaiichi) mintáin is. A mérések eredményei jelentős különbségeket tártak fel az egyes BR formák hajtásban és gyökérben felhalmozott mennyiségei közt, ugyanakkor ezek tendenciái az egyes vegyületek abszolút mennyiségeinek eltérései ellenére is mindhárom fajban hasonlóak voltak (6. táblázat). Figyelemreméltó módon a BR

	Arabidonsis		borsó		naradicsom	
BR	hajtás	gyökér	hajtás	gyökér	hajtás	gyökér
6-dezoxokataszteron	790	1800	670	5100	640	2800
6-dezoxoteaszteron	100	170	85	330	150	120
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	180	320	73	670	16	63
6-dezoxotifaszterol	540	970	1700	4300	250	480
6-dezoxokasztaszteron	220	90	11700	630	330	180
kataszteron	ND	ND	ND	ND	ND	ND
teaszteron	ND	ND	ND	2	ND	ND
3-dehidroteaszteron	ND	ND	ND	ND	ND	ND
tifaszterol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
kasztaszteron	150	35	690	38	140	11
brasszinolid	nyom	nyom	ND	24	ND	ND

6. táblázat: Arabidopsis, borsó és paradicsom hajtások, ill. gyökerek BR tartalma

20 napos Arabidopsis, 13 napos borsó. és 36 napos paradicsom minták GC-MS analízisének adatai (ng/kg friss tömeg). ND: nem detektált.

szintézisút korábbi szakaszához tarozó 6-dezoxokataszteron, 6-dezoxoteaszteron, 3dehidro-6-dezoxoteaszteron és 6-dezoxotifaszterol inkább a gyökérzetben, míg a végtermék BL-hoz közelebbi 6-dezoxokasztaszteron és kasztaszteron preferáltan a hajtásokban dúsultak fel. Szintén mindhárom faj esetében a kimutathatósági szint körül, vagy az alatt volt a korai C-6-oxidációs út intermediereinek mennyisége. Szintén említésre érdemes a C-23 hidroxiláció szubsztrátjának tekintett 6-dezoxokataszteron markáns túlsúlya a gyökérben, ami összhangban látszik lenni azzal, hogy a 23hidroxilációhoz szükséges CPD/CYP90A1 ebben a szervben igen alacsony szinten fejeződik ki.

### 4.2.2.6. A BR szintézis visszacsatolásos szabályozásának élettani szerepe

A BR-ok élettani szempontból optimális szintjének kialakításához és fenntartásához bioszintézisük folyamatainak érzékeny és rugalmas szabályozására van szükség. A BR intermedierek pool-jainak vizsgálata *Arabidopsis*ban, borsóban és paradicsomban azt mutatta, hogy a szintézis folyamatában a C-22 és C-23 hidroxiláció, valamint C-6 oxidáció lehetnek olyan konverziós lépések, amelyek a BL képződésének sebességét limitálhatják (Nomura és mtsai, 2001). Mindhárom reakciót a CYP85 és CYP90 családokhoz tartozó monooxigenázok katalizálják, ezért várható volt, hogy ezen enzimek kifejeződésének mértéke befolyásolhatja a szintézisút hatékonyságát.

Korábban kimutattuk, hogy a *CPD* gén expresszióját a BR bioszintézis végtermékeként létrejövő BL egy transzkripciós szintű negatív visszacsatolás révén gátolja. A további vizsgálatok kiderítették, hogy BL kezeléssel az *Arabidopsis* valamennyi *CYP85* és *CYP90* transzkriptumának mennyisége jelentősen csökkenthető volt. Ez a hatás időben és mértékében valamennyi mRNS esetében hasonló volt, ami arra utalt, hogy a BR-bioszintetikus P450 gének működését a BR-ok összehangoltan, azonos mechanizmus révén kontrollálják. Ezt pár év múlva aztán megerősítette, hogy a szabályozásért felelős BZR1 transzkripciós represszor azonosítása során meghatározott kötő-szekvenciát (He és mtsai, 2005) megtalálták valamennyi *CYP85* és *CYP90* gén promóterben.

A *CPD* esetében azt is kimutattuk, hogy kifejeződése a BL-dal koncentrációfüggő módon represszálható, és hogy ez a hatás már 1 nM koncentrációnál jól megfigyelhető (22. ábra A). Ezzel szemben a gén fokozott expresszióját tapasztaltunk BR-hiányos és -inszenzitív mutánsokban. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a vad típusú növényekben a *CPD* olyan részlegesen represszált állapotban van, amely a BR koncentráció függvényében mind pozitív, mind negatív irányba flexibilisen változik. Következésképp a *CPD*-t és a többi BR-bioszintetikus P450 gént kontrolláló visszacsatolási hurok egy olyan fiziológiás szabályozási mechanizmusnak tekinthető, amely az optimális hormonszint kialakítása érdekében képes az expresszió folyamatos modulálására. A hormonszint megfelelő korlátok közt tartását szolgálja a biológiailag aktív BR-okat inaktiválni képes, szintén P450 típusú BAS1/CYP734A1 (Neff és mtsai, 1999). A szabályozás logikájából adódóan ezen enzim szintén BR-regulált génje a bioszintetikus génekkel ellentétben nem negatív, hanem pozitív visszacsatolással szabályozott, ugyancsak transzkripciós szinten (Choe és mtsai, 2001). Később közölt eredmények alapján tudható, hogy a BAS1 a kasztaszteron és BL biológiai aktivitását közömbösítő C-26 hidroxilációt katalizálja (Turk és mtsai, 2005).

A BR-okéhoz hasonló, a transzkripció szintjén ható negatív visszacsatolásos szabályozás felelős egy másik fitohormon-csoport, a gibberellinek szintézisének egyensúlyáért is. Ebben az esetben csak a szintézisút két utolsó enzimét, a GA 20-oxidázt és a GA 3β-hidoxilázt kódoló gének transzkripciója gibberellin-szabályozott (Yamaguchi és Kamiya, 2000), de ezek révén is megfelelően kontrollált a bioszintézis sebessége. Nem világos, hogy a BR anyagcsere szempontjából milyen előnnyel járhat, hogy a végtermék-szabályozás a szintézis valamennyi P450 génjére kiterjed.

Vizsgálataink idején a CYP90C1 enzimnek még nem tulajdonítottak szerepet a BR szintézisben (Kim GT és mtsai, 1999), a CYP90D1 funkciója pedig - megfelelő mutáns hiányában - teljesen ismeretlen volt. E két P450-ről elsősorban a CYP90 családhoz tartozásuk alapján feltételeztük, hogy a BR anyagcsereútban vehetnek részt, de a CYP90C1-deficiens *rot3* mutánsnál erre utaltak a rövid, lekerekített levelek is (Kim GT és mtsai, 1998). Ezt az elképzelést erősítette meg, hogy a *CYP90C1* és *CYP90D1* az ismert BR-bioszintetikus génekhez hasonlóan BL-represszálható volt. Később mutánsok segítségével bizonyítani lehetett a két gén szerepét a BR-ok szintézisében (Kim GT és mtsai, 2005).

Az Arabidopsis magvak a termésérés során nagy mennyiségű BR-ot halmoznak fel (Fujioka és mtsai, 1998). Ez a hormonkészlet fontos a csírázás folyamatainak szabályozásához, ugyanakkor a *CYP85* és *CYP90* gének erőteljes indukciója azt mutatja, hogy a korai csíranövény szakaszban jelentős *de novo* BR szintézisre is szükség van. Az egyedfejlődés zavartalanságát biztosítja a bioszintetikus folyamatok szervspecifikus regulációja is. Bár adataink a gyökerekben erős *ROT3/CYP90C1* és *CYP90D1* kifejeződést és jelentős BR metabolit felhalmozódást mutattak, a kulcsfontosságú *CPD* és *CYP85A2* gyenge aktivitásával párhuzamosan a bioaktív BR mennyiség igen alacsony. A fiziológiailag kevésbé jelentős C<sub>28</sub> BR-ok esetében az intermediereinek és végtermékeinek hasonló szervspecifikus megoszlását írták le paradicsom növényeknél is (Yokota és mtsai, 2001). Élettanilag fontos, hogy a bioszintetikus gének differenciált szabályozása révén az aktív BR formák nem halmozódhatnak fel a gyökérzetben, ahol már nM alatti koncentrációkban gátolják a fejlődést (Clouse és Sasse, 1998).

Míg a BR szintézis kezdeti lépéseiért felelős, nem P450 jellegű DIM1 és DET2 enzimek génjei sem BL (nem bemutatott adat), sem szervspecifikus reguláltságot nem mutattak, a CYP85 és CYP90 gének kifejeződése mind hormonálisan, mind fejlődésés szervspecifikusan szabályozott volt. Eredményeink arra utaltak, hogy a P450 gének expressziójának kontrollja a BR-ok szintézisén keresztül érdemben kihathat e hormonok felhalmozódására, és ezáltal regulatív funkciókra. Egyrészt a CYP85 és CYP90 transzkriptumoknak a csírázást követő átmeneti felhalmozódása egybeesett csíranövények fejlődésének ismerten BR-igényes intenzív differenciációs és megnyúlási folyamataival. Másrészt figyelemreméltó volt, hogy a gyökerekben a C-23 hiroxilációhoz szükséges CYP90A1 gyenge kifejeződése együtt járt a szubsztrátjául szolgáló 6-dezoxokataszteron felhalmozódásával, valamint a későbbi intermedierek mennyiségének redukciójával. Mára részben saját adataink, részben más munkacsoportok (Symons és Reid, 2004) eredményei alapján ismert, hogy a BR-ok hatásukat autokrin/parakrin módon, szintézisük közvetlen környezetében fejtik ki, és megerősítést nyert, hogy ebben meghatározó szerep jut bioszintézisük szerv-, ill. szövetspecifikus szabályozásának (Nomura és mtsai, 2005 és 2007; Symons és mtsai, 2006).

#### 4.2.3. Az Arabidopsis CYP85 génjeinek differenciált működése

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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]

A BR bioszintézis igen fontos lépése a 6-dezoxokasztaszteront kasztaszteronná alakító C-6 oxidáció, amely a BL képződés utolsó előtti reakciója. Egyrészt a közvetlen prekurzor 6-dezoxokasztaszteron és a kasztaszteron mennyisége közti nagyságrendi különbség a reakció sebesség-meghatározó jellegére utalt (Nomura és mtsai, 2001; Shimada és mtsai, 2003), másrészt a kasztaszteronról feltételezhető volt, hogy biológiai aktivitással rendelkezik, mert paradicsomban BL nem volt kimutatható (Yokota, 1997; Bishop és mtsai, 1999). A CYP85 P450 családba tarozó C-

6 oxidázok közül először a paradicsom *Dwarf* génje által kódolt CYP85A1-et sikerült azonosítani, melynek hiánya törpeséget eredményez (Bishop és mtsai, 1996 és 1999). Később két törpe rizsfajta esetében volt megállapítható, hogy növekedési rendellenességük oka a *Dwarf* rizs ortológjának mutációja (Hong és mtsai, 2002; Mori és mtsai, 2002). Míg a súlyos hiánytünetek ara utaltak, hogy paradicsomban és rizsben a CYP85 funkciót egyetlen génkópia kódolja, *Arabidopsis*ból két *CYP85* gén vált ismertté (Shimada és mtsai, 2001 és 2003).

Arabidopsisban a két CYP85 génhez köthető törpe mutánsok hiánya azt sugallta, hogy az ezek által kódolt enzimek legalább részben képesek egymás funkcionális helyettesítésére. Ennek alapján munkánk célja az volt, hogy megismerjük e két fontos BR-bioszintetikus gén működésének fejlődés- és szervspecifikus szabályozását, valamint élettani szerepük viszonyát.

#### 4.2.3.1. A CYP85 gének időbeni kifejeződése

Korábbi RT-PCR és cDNS "microarray" vizsgálatok (saját adataink; Shimada és mtsai, 2003) kimutatták a *CYP85A1* és *CYP85A2* transzkriptumok differenciált felhalmozódását, de a megfelelő gének időbeni és térbeli kifejeződése jórészt ismeretlen maradt. A precízebb analízis céljából izoláltuk a *CYP85A1* és *CYP85A2* promóterek és 5' nem transzlált régiók 1,8 kb-os szakaszát, majd ezeket riportergénekkel fuzionáltattuk. Az így kialakított *CYP85A1:GUS*, *CYP85A2:GFP* és *CYP85A2:LUC* konstrukciókkal stabil transzgenikus *Arabidopsis* vonalakat hoztunk létre.

Az egyedfejlődés első három hetét felölelő GUS hisztokémiai analízis során jól kimutatható volt a két *CYP85* promóter aktivitása közti különbség. A *CYP85A1:GUS* növények a csírázástól számított első négy napban csak a hipokotilban és a gyökérben mutattak festődést, amely elsősorban a szállítónyalábokban volt erős. Ezt követően a csökkenő GUS aktivitás a hipokotilra és a csúcsi merisztémára szorult vissza, és a hetedik nap után már nem volt észlelhető. A sziklevelekben festődést nem, vagy csak alig lehetett látni (33. ábra A). Ezzel szemben a *CYP85A2:GUS* transzgén a csírázást követően sziklevelekben, hipokotilban és gyökérben is markánsan kifejeződött, és bár ennek intenzitása idővel szintén csökkent, még a 21. napon is jól kimutatható volt (33. ábra B).



33. ábra: Az Arabidopsis CYP85 génjeinek időbeni kifejeződése

A GUS aktivitás eloszlása MS médiumon LD fényviszonyok mellett csíráztatott és nevelt *CYP85:GUS* transzgenikus növényekben. A: *CYP85A1:GUS* embriók (1-4), 2, 4, 7, 11, 15 és 21 napos növények (5-10) és virágok (11-12), B: *CYP85A2:GUS* embriók (1-4), köldökzsinórok (5-6), 2, 4, 7, 11, 15 és 21 napos növények (7-12) és virágok (13-14). A lépték 0,1 (A 1, 2, 3, B 1, 2, 3), 0,2 (A 4, B 4, 5) 0,5 (A 5, B 6, 7), 1 (A 6, 7, 11, B 8, 13), 2 (B 9) és 5 (A 8, 9, 10, 12, B 10, 11, 12, 14) mm-nek felelnek meg.



34. ábra: A *CYP85:GFP* fúziós gének expressziója a szállítószövetben MS médiumon LD fényciklusban nevelt egyhetes transzgenikus csíranövényekről MRC 1024 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (BioRad, Santa Clara, CA, USA) készült felvételek. Az egyes képeken a GFP fluoreszcencia látható a *CYP85A1:GFP* (A 1-3), ill. *CYP85A2:GFP* (B 1-3) csíranövények nyilakkal azonosított régiókban (C), valamint *CYP85A2:GFP* növények gyökérzetének (D) oldalgyökér-kezdeményén (1), szállítószövetében (2), és csúcsi részén (3).

A reproduktív szervekben a *CYP85A1:GUS* kifejeződése nem volt megfigyelhető (33. ábra A). A *CYP85A2:GUS* expresszió viszont festődést eredményezett a virágkocsányban, a csészelevelekben, szirmokban, valamint a termő csúcsi részén is. A GUS aktivitás jelen volt a fejlődő becőkben is, ahol különösen a magkezdemények köldökzsinórjában (*funiculus*) volt intenzív. Igen gyenge festődés az embriókban is kimutatható volt azok kifejlett állapotában (33. ábra B).

# 4.2.3.2. Szerv- és szövetspecifikus expresszió

Csíranövényeknél a két vizsgált CYP85 gén kifejeződése jelentősen eltérő volt a sziklevelekben, ahol a CYP85A1 működése nem volt kimutatható, a CYP85A2 viszont erős aktivitást mutatott. Ugyanakkor mindkét gén elsősorban a vaszkuláris elemekben, valamint a gyökérnyak és a hajtáscsúcs környékén expresszálódott (33. ábra A, B). *CYP85A1:GFP* és *CYP85A2:GFP* csíranövényekben különösen jól látszott a transzgén preferenciális működése a szállítószövetben (34. ábra). A kifejlett növényben is működő *CYP85A2* promóter luciferázos fúziója is főként a vaszkuláris nyalábokban mutatkozott aktívnak. A *CYP85A2:LUC* növényeken emellett megfigyelhető volt, hogy a transzgén magas szinten elsősorban a hajtáscsúcs környékén és a fiatal levelekben fejeződik ki, míg a levelek korával az expresszió mértéke fokozatosan csökken (35. ábra).



35. ábra: A CYP85A2:LUC transzgén aktivitása háromhetes növényben MS táptalajon LD viszonyok közt nőtt növény fényképe (A), valamint nagy érzékenységű CCD kamerával detektált LUC eredetű lumineszcenciája (B). A hamis színezésű CCD felvételen az erős LUC aktivitásnak a fehér és piros, míg az alacsony szintűnek a kék és lila régiók felelnek meg.

# 4.2.3.3. A CYP85 gének 5' szabályozó szekvenciáinak összehasonlítása

A CYP85A1 és CYP85A2 proteinek aminosav-szekvenciáinak nagyfokú (82%os) egyezése mellett nem volt meglepő, hogy heterológ élesztő rendszerben kifejeztetve mindkettő esetében azonos enzimatikus funkciót határoztak meg, amely többféle, de szerkezetileg hasonló szubsztrát C-6 oxidációját is katalizálni tudta (Shimada és mtsai, 2001 és 2003). Tekintettel arra, hogy a *CYP85A1* és *CYP85A2* gének kifejeződési mintázata lényegesen különbözött, a TAIR adatbázisban (www.arabidopsis.org) elérhető adatok alapján összehasonlítottuk a regulációért felelős promóterek és 5' nem kódoló régiók szekvenciáit.

A CYP85A1 és CYP85A2 szabályozó szekvenciák optimalizált illesztése (36. ábra B) számos rövid homológ szakaszt azonosított, amelyek főként az 5' nem kódoló részben és a feltételezett transzkripciós start-szignálok (ún. TATA boxok) környékén voltak találhatók. A TATA szekvenciák a *CYP85A1* esetében 71, a *CYP85A2*-nél 33 bp távolságra voltak a leghosszabb ismert cDNS szekvenciák 5' végétől, és a paradicsom *Dwarf/CYP85A1* génjében is megtalálható CTATATAAACA motívum részét képezték (36. ábra B). A promótereknek a kódoló régiótól távolabbi szakaszain a homológia





mértéke fokozatosan csökkent, és a transzlációs starttól mintegy 500 bp után már jelentéktelen volt (nem bemutatott adat).

Az Arabidopsis 5. kromoszómáján a CYP85A1 kódoló szekvenciája előtt 1,8 kbnyira már a *Ty1* copia-szerű retrotranszpozon helyezkedett el, behatárolva a promóter lehetséges hosszát. Ezzel szemben a 3. kromoszómán a *CYP85A2* kódoló szakasztól 5' irányban a legközelebbi azonosított funkcionális elemig (*MuDR* transzpozáz-szerű szekvencia) igen hosszú, 13 kb-nyi ismeretlen DNS régió volt található (36. ábra A).

# 4.2.3.4. A paradicsom Dwarf: GUS fúzió kifejeződése Arabidopsisban

Az Arabidopsistól eltérően paradicsomból csupán egyetlen, a Dwarf gén által kódolt CYP85 volt ismert (Bishop és mtsai, 1996 és 1999). A két növényfajban működő szabályozás összehasonlítása végett a Dwarf promóter 1,2 kb-os szakaszát fuzionáltattuk a GUS riporterrel, és az így létrehozott konstrukció expresszióját



37. ábra: A paradicsom *Dwarf:GUS* fúzió kifejeződése és BL-represszálhatósága transzgenikus *Arabidopsis*ban

Ötnapos LD körülmények közt, hormonmentes (A), ill. 1 µM BL-ot tartalmazó MS médiumon csíráztatott és nevelt csíranövények. A képeken a lépték 5 mm-nek felel meg.

transzgenikus *Arabidopsis*ban tanulmányoztuk. Vizsgálatunk során a *Dwarf* promóter aktivitása a *CYP85A2*-éhez hasonló, bár attól valamivel gyengébb volt. A fúziós géntől eredő GUS aktivitás elsősorban a gyökérben, a gyökérnyakban és a hajtáscsúcson volt erőteljes (37. ábra A), ami jól egyezett a paradicsomban megfigyelt kifejeződési

mintázattal is (saját adataink). A hasonló szervspecifikus kifejeződés mellett *Dwarf* promóter paradicsomban észlelt BR-represszálhatósága (saját adataink) is kimutatható volt (37. ábra B). Mindez az *Arabidopsis* és paradicsom *CYP*85 gének transzkripciós szabályozásának konzervatív voltát mutatta.

# 4.2.3.5. A CYP85A1 és CYP85A2 gének funkciómegosztása

Míg a paradicsom és rizs esetében egyetlen *CYP85* gén inaktiválása súlyos törpeséget eredményezett (Bishop és mtsai, 1996; Hong és mtsai, 2002), *Arabidopsis*nál a C-6 oxidációban defektív törpe mutánsok hiánya a *CYP85A1* és *CYP85A2* gének redundáns szerepét sugallta. Erre utalt szekvenciáik nagyfokú homológiája is. Mindezt megerősítette, hogy míg a T-DNS inszercióval létrehozott SALK mutánsok közt egy-egy *cyp85a1* és *cyp85a2* vonal nem, vagy alig mutatott észlelhető fenotípust, a kettős mutáns jellegzetes BR-deficiens törpe volt (Nomura és mtsai, 2005: munkánk idején csak személyes közlés). A funkcionális redundancia lehetőséget nyújt az *Arabidopsis CYP85* génjeinek differenciált transzkripciós szabályozására, amelynek létezését RT-PCR (saját adataink) és cDNS-hibridizációs eredményekkel (Shimada és mtsai, 2003) igazolni is lehetett. Ezek a módszerek viszont nem voltak alkalmasak a génkifejeződés olyan pontos lokalizálására, amit a promóter-riporter fúziók segítségével el lehetett érni.

Adataink azt mutatták, hogy az *Arabidopsis* két *CYP85* génje közül a *CYP85A2* expressziója erősebb, inkább a hajtásban lokalizált, míg a gyengébben kifejeződő *CYP85A1* csak a fejlődés korai szakaszában nyilvánult meg. Ezek az eredmények jól egyeztek a GENEVESTIGATOR adatbázis (Zimmermann és mtsai, 2004; www.genevestigator.etzh.ch) ún. digitális Northern adataival, amelyek a teljes *Arabidopsis* genomot lefedő "microarray" hibridizációs kísérletek alapján a *CYP85A1* kifejeződést minden fejlődési stádiumban és szervben a zajszinthez közelinek mutatták.

Mindhárom típusú riporterrel követett *CYP85* aktivitás igen markáns volt a szállítószövetekben. A vaszkulatúra környékén aktív BR szintézist lehetett feltételezni, mert a trachea elemek differenciációjával párhuzamosan e hormon felhalmozódását észlelték, és mert a BR-deficiens törpe mutánsokban rendellenes xilém fejlődés volt megfigyelhető (Fukuda, 1997; Yamamoto és mtsai, 2001). A későbbi vizsgálatok azt is kimutatták, hogy *Zinnia elegans*ban a CYP85 és CYP90 enzimek ortológjai összehangoltan indukálódtak a xilémképződés folyamán (Yamamoto és mtsai, 2007).

A GUS festődés és LUC lumineszcencia eloszlása egyaránt azt mutatta, hogy a *CYP85A2* igen erősen expresszálódik a hajtáscsúcs régiójában, ahol intenzív *CPD* aktivitás is megfigyelhető volt. Ezzel kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy paradicsomban a levelek kialakulásának tanulmányozásakor a *CYP85* transzkriptum megjelenése a legkorábbi differenciációs stádiumokra jellemző markernek bizonyult (Pien és mtsai, 2001). A fontos bioszintetikus gének magas aktivitása a levelek képződése során valószínűleg szorosan összefügg az intenzív sejtmegnyúlási és szöveti differenciációs folyamatok fokozott BR igényével.

A CYP85A1 és CYP85A2 nagyfokú aminosav-szekvencia egyezése és a génjeik 5' szabályozó régióiban megfigyelhető homológia arra enged következtetni, hogy *Arabidopsis*ban a C-6 oxidáz funkciók redundanciája viszonylag újonnan kialakult duplikáció eredménye lehet. Figyelemreméltó, hogy mindkét *CYP85* gén transzpozonszerű szekvenciák szomszédságában található, így elképzelhető, hogy a megkettőződés transzpozíción alapuló rekombinációs eseményként jöhetett létre. Bár a duplikáció következtében a két gén reguláltsága változott, a promóterek hasonlóságának megfelelően közös expressziós tulajdonságok (pl. erős szállítószöveti kifejeződés) is felismerhetők. Emellett a *Dwarf* promóter igen hasonló működése paradicsomban és transzgenikus *Arabidopsis*ban arra utal, hogy a *CYP85* gének regulációja a kétszikűek körében jól konzervált mechanizmusra épül.

A fitohormonok bioszintézisében jól ismert jelenség, hogy redundáns funkciók differenciált szabályozás réven időben és térben különböző módon lépnek működésbe. Rizsben például két gibberellin 20-oxidáz gén ismert, melyek a BR szintézis génjeihez hasonló transzkripciós szintű negatív visszacsatolással gibberellin-represszálhatók. De míg GA20ox-1 elsősorban a virágzatban fejeződik ki, a GA20ox-2 a levelekben és virágokban egyaránt aktív, és funkcióvesztése törpeséghez vezet (Ashikari és mtsai, 2002). Utóbb ismertté vált, hogy a CYP85A1 és CYP85A2 enzimatikus funkciói nem teljesen azonosak. Bár mindkét P450 a biológiailag aktív BR formák létrehozásáért felelős és egyaránt katalizálja a 6-dezoxokasztaszteron  $\rightarrow$  kasztaszteron átalakulást (3. ábra), pontosabb vizsgálatok kiderítették, hogy a CYP85A1-gyel ellentétben a CYP85A2 az ezt követő, BL-ot termelő Baeyer-Villiger laktamizációért is felelős (Kim TW és mtsai, 2005; Nomura és mtsai, 2005). E funkcionális különbség élettani szerepe Arabidopsisban még tisztázatlan, de paradicsomban egy, a CYP85A2-vel azonos specificitású második CYP85 (CYP85A3) felfedezése kapcsán kiderült, hogy a laktamizációs reakció és a BL termelés meghatározó fontosságú a termés kialakulásának folyamatában (Nomura és mtsai, 2005).

A promóterek működésének tanulmányozását nagymértékben segíti a riporter fúziók alkalmazása, ugyanakkor mindig fontos kérdés, hogy a létrehozott transzgén aktivitása, illetve a riporterek mérhető paraméterei mennyire precízen tükrözik a vizsgálandó gén tényleges transzkripciós aktivitását. Amellett, hogy eredményeinket mindig ennek figyelembevételével kellett értékelnünk, megbízhatóságukat igazolta a direkt mRNS analízisek adataival való jó egyezés, valamint a különböző riporterekkel kapott kifejeződési mintázatok hasonlósága is. Annak ellenére, hogy a riporterek detektálhatósága - stabilitásától függően - eltérhetett a pillanatnyi transzkripciós aktivitástól, használatuk az expresszió igen pontos lokalizálását tette lehetővé.

### 4.2.4. A paradicsom Dwarf génjének működése

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K<sup>'</sup>, 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]

A paradicsom nemcsak értékes haszonnövény, hanem mint genetikailag jól karakterizált faj a termés kialakulásának és érési folyamatainak tanulmányozására kiválasztott ígéretes modell objektum is (Giovannoni, 2001 és 2004). A termésfejlődést befolyásoló számos mutáns közül néhány a hormonális szabályozás szintjén okoz zavarokat. Ilyen például a *never ripe* (*nr*), amely az etilén szignálutat inaktiválja, ezáltal gátolva a termés érését (Lanahan és mtsai, 1994; Wilkinson és mtsai, 1995). A gibberellin-deficiencia szintén fejlődési problémákat okoz, és az ilyen mutánsokban a megfelelő virág- és termésképződés csak gibberellin kezelés mellett érhető el (Groot és mtsai, 1987; Nester és Zeevaart, 1988). A BR-ok szerepe a reproduktív szervek fejlődésében ismeretlen volt, de tudni lehetett, hogy a C-6 oxidációban sérült *dwarf* mutáns súlyos növekedési defektusa ellenére is fertilis virágok és termés képzésére képes (Bishop és mtsai, 1996). Bár *Arabidopsis*ban a súlyos BR-deficiencia késői virágfejlődést (Chory és mtsai, 1991) és hímsterilitást (saját adataink) is okozott, *dwarf* paradicsom növényekben ezek a tünetek nem voltak megfigyelhetők.

Annak ellenére, hogy nagy hatékonyságú transzkriptum analízisek eredményeként sok BR-regulált gén, és néhány ezekhez köthető folyamat is ismertté vált (Vert és mtsai, 2005), továbbra is jórészt tisztázatlan maradt, hogy a növényekben melyek a BR szintézis elsődleges helyei. A BR bioszintézis génjeinek kifejeződéséről rendelkezésre álló adatok elsősorban *Arabidopsis*on végzett RT-PCR és cDNS "microarray" kísérletekből (saját adataink; Goda és mtsai, 2002 és 2004b; Müssig és

mtsai, 2002; Shimada és mtsai, 2003), valamint promóter-riporter fúziók expressziójának analíziséből (saját adataink) származtak, és határozott szervspecifikus különbségeket mutattak.

Az Arabidopsis CYP85 gének differenciált aktivitásának ismeretében munkánk célja az volt, hogy megvizsgáltuk az ezek paradicsom ortológjának számító *Dwarf* pontos kifejeződési mintázatát is RT-PCR, valamint promóter-riporter fúziót hordozó transzgenikus növények felhasználásával. Tekintettel arra, hogy a paradicsom



38. ábra: A *Dwarf:GUS* fúzió kifejeződése transzgenikus paradicsomban MS táptalajon LD fényviszonyok mellett csíráztatott és nevelt *Dwarf:GUS* transzgenikus növények hisztokémiai festődése. Egyhetes, független transzgenikus vonalakból származó csíranövények (A). Kéthetes növény csúcsi része (B) és annak keresztmetszete (C). Gyökércsúcs (D) és keresztmetszete (E), valamint oldalgyökérkezdemények (F) és keresztmetszeti képük (G).

méreténél fogva lehetőséget ad a hormoneloszlás meghatározására, a várhatóan differenciált kifejeződés esetén tanulmányozni kívántuk a *Dwarf* expresszió és a BR tartalom közötti viszonyt is az egyes szervekben.

# 4.2.4.1. A Dwarf gén expressziója csíranövényekben

Kísérleteinkhez a *Dwarf* promóter 1,2 kb-os szakaszát fuzionáltattuk a *GUS* riporterrel, majd a kapott génkonstrukcióval transzgenikus paradicsom vonalakat hoztunk létre. Ezeknél a hisztokémiai reakció intenzitása valamelyest különbözött ugyan, de annak eloszlása minden esetben hasonló volt (38. ábra A). A további analízishez ezután egyetlen, reprezentatív vonal utódait használtuk. A GUS aktivitás eloszlását vizsgálva a legerősebb festődést a hajtások és gyökerek csúcsi részén,



39. ábra: A GUS festődés és a *Dwarf* mRNS szintjének viszonya *Dwarf:GUS* csíranövényekben

A: Tíznapos, GUS aktivitásra festett csíranövény, a transzkriptum analízishez használt részek megjelölésével. B: Az "A" panelen azonosított régiókból származó RNS-ekkel kapott RT-PCR termékek. Konstitutív belső kontrollként az *Actin*-specifikus reakciót használtuk.

valamint az oldalgyökér-kezdemények környékén kaptuk (38. ábra B, D, F). A keresztmetszeti képeken jól látható volt, hogy a hajtás- és gyökércsúcs környékén egyaránt a szubmerisztematikus régiók mutatták a legnagyobb GUS aktivitást, továbbá erőteljes festődés mutatkozott a szállítószövetekben és a kialakuló oldalgyökerekben is (38. ábra C, E, G).

A GUS aktivitás és az endogén *Dwarf* mRNS-szint megfelelő korrelációjának ellenőrzésére párhuzamosan hisztokémiai és félkvantitatív RT-PCR analízist végeztünk tíznapos *Dwarf:GUS* transzgenikus csíranövényeken. Ennek során mindkét megközelítéssel a hajtáscsúcs környezetében és a sziklevelekben jelezte a legintenzívebb *Dwarf* aktivitást (39. ábra A, B), megerősítve a transzkriptum és riporter alapú vizsgálatok adatainak jó összevethetőségét.

#### 4.2.4.2. A Dwarf kifejeződése a virág- és termésfejlődés során

A paradicsom a reproduktív fejlődés fontos modellfaja, ezért részletesen megvizsgáltuk a *Dwarf* kifejeződését a virágok és termés kialakulásának egyes szakaszaiban. Ennek során *Dwarf:GUS* transzgenikus növények reproduktív szerveinek különböző stádiumaiban szedett mintákat analizáltunk GUS hisztokémiai festés és RT-PCR felhasználásával. A virágzásnál a legerősebb GUS aktivitás a



# 40. ábra: A Dwarf gén expressziója a virágfejlődés során

A: Üvegházi körülmények közt nevelt növényekről származó virágok GUS hisztokémiai festődése. A minták fejlődési stádiumok szerint: < 7 mm (1) és > 7 mm (2) bimbó, valamint nyíló (3) és teljesen kinyílt virág (4). B: Az "A" panel virágfejlődési stádiumaiból származó RNS-ekkel végzett RT-PCR termékei. C: Teljesen kinyílt virágok részeiből: csésze- (cs) és sziromlevelekből (sz), porzókból (p), termőkből (t), virágkocsányokból (k) és teljes virágokból (v) nyert RNS-ekkel végzett RT-PCR reakciók termékei.

termőlevelekben és a virágkocsányban volt megfigyelhető (40. ábra A). Ugyanakkor RT-PCR módszerrel a virágkezdeményekben, kifejlett állapotban pedig a virágkocsányban észleltünk magas *Dwarf* transzkriptumszintet (40. ábra B, C).

A termésben a vizsgált, érés előtti időszak során a transzgén aktivitása a növekedéssel egyre intenzívebbé vált. Az erős GUS festődés elsősorban a magfejlődéssel párhuzamosan, a placentában volt magas, míg a perikarpiális szövetekben gyengébb kifejeződés volt tapasztalható (41. ábra A). Az RT-PCR analízis az egyes stádiumokban viszonylag egyenletes *Dwarf* mRNS-szintet mutatott ki, viszont megerősítette a placenta és perikarpium között hisztokémiai módszerrel észlelt expressziós különbségeket (41. ábra B).





A: Üvegházi körülmények közt nevelt növényekről származó termések szeleteinek GUS hisztokémiai festődése. A minták fejlődési stádiumok és a termésen belüli helyzetük szerint: 3 mm-es (1), 8 mm-es (2), 1 cm-es (3), 2-2,5 cm-es (4), 3,2 cm-es teljes termés (5), ill. annak placenta (6) és perikarpium (7) része, valamint 5 cm-es teljes termés (8), ill. annak placenta (9) és perikarpium (10) része. B: Az "A" panelen bemutatott termésfejlődési stádiumokból, ill. termésrészekből származó RNS-ekkel végzett RT-PCR termékei.

# 4.2.4.3. Erőteljes BL felhalmozódás a termésérés során

A GUS és RT-PCR vizsgálatok stádiumainak (41. ábra) megfelelő fejlettségű teremésekben GC-MS analízissel meghatároztuk az endogén BR-ok mennyiségét. Ennek legmeglepőbb eredménye az volt, hogy a termés mintákban nagy mennyiségű BL-ot lehetett kimutatni. Meglepő módon a mért BL mennyiségek jóval magasabbak voltak a paradicsom aktív BR formájának tekintett kasztaszteronénál (7. táblázat). A placenta és perikarpium *Dwarf* aktivitása közti markáns különbség miatt ezekben a

termésrészekben külön is meghatároztuk a BR-ok szintjét. Méréseink szerint az erős BL felhalmozódás a perikarpiumra nem, csak a fejlődő magokat is tartalmazó placentális frakcióra volt jellemző, ahol egyidejűleg a CYP85 C-6 oxidázt kódoló *Dwarf* erős kifejeződését is megfigyeltük. A magas BL tartalom mellett a placentában zajló igen aktív C-6 oxidációra utalt a reakció szubsztrátjául szolgáló 6-dezoxokasztaszteron pooljának jelentős leapadása, ami a perikarpiális és a vegetatív minták adataival összehasonlítva jól látható volt (7. táblázat).

BR	fejlődési stádium, ill. termésrész						
	3.	4.	5.	6.	7.	veg.	
6-dezoxoteaszteron	ND	ND	ND	ND	38	44	
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	20	45	44	67	29	31	
6-dezoxotifaszterol	ND	ND	ND	ND	ND	466	
6-dezoxokasztaszteron	1548	695	1101	68	1515	5253	
kasztaszteron	41	483	34	71	47	217	
brasszinolid	3468	3398	1613	2089	96	ND	

7. táblázat: Fejlődő paradicsom termés BR tartalmának változása

A 41. ábrán bemutatott fejlődési stádiumokból és termésrészekből, valamint 8 hetes növények 8. leveléig gyűjtött vegetatív szervekből (veg.) GC-MS analízissel meghatározott BR tartalom (ng/kg friss tömeg). ND: nem detektált.

### 4.2.4.4. A BR-ok vaszkuláris transzportjának hiánya

A paradicsom termés magas BL tartalma ellenére ugyanezen növények vegetatív szerveiben ez az aktív BR forma nem volt kimutatható. Elképzelhető volt, hogy ennek oka a termés felhasználó (sink) szerv jellege. Ennek tisztázása végett reciprok oltási kísérletet végeztünk vad típusú és a *Dwarf* null-alléljét hordozó *d*<sup>K</sup> (ún. "extreme dwarf") növényekkel. Azt tapasztaltuk, hogy az oltványokban a vad típusú rész sem alanyként, sem oltóvesszőként nem tudta enyhíteni a mutáns partner BR-hiányos törpeségét (42. ábra). Ez az eredmény egyértelműen a hatékony BR transzport hiányára utalt.



42. ábra: Reciprok oltási kísérletek vad típusú és *d*<sup>K</sup> mutáns paradicsom vonalakkal BR-deficiens *d*<sup>K</sup> alannyal és vad típusú oltóvesszővel (A), ill. vad típusú alannyal és *d*<sup>K</sup> vesszővel (B) létrehozott háromhetes oltványok.

# 4.2.4.5. A Dwarf gén szerepe a reproduktív fejlődésben

Munkánk egyik fontos célja az volt, hogy felderítsük a BR bioszintézis szempontjából legfontosabb régiókat a növényen belül. Az erre irányuló korábbi RT-PCR vizsgálatok jelezték a bioszintetikus gének differenciált kifejeződését (saját adataink; Shimada és mtsai, 2003), de viszonylag pontos lokalizálásukra csak a promótereik riportergénes fúzióival végzett analízisek alapján nyílt mód (saját adataink). A *Dwarf Arabidopsis* ortológjainak expresszióját tanulmányozva megállapítható volt, hogy míg a *CYP85A1* csak gyenge, és a korai fejlődés időszakára korlátozott aktivitással rendelkezik, a hajtás- és gyökércsúcs környékén erősen kifejeződő *CYP85A2* működése igen hasonló a *Dwarf/CYP85* généhez (saját adataink). A *Dwarf* aktivitás apikális lokalizációja jól illeszkedett ahhoz, hogy az általa

kódolt P450 enzim a BR bioszintézis egy szorosan kontrollált reakcióját katalizálva (Nomura és mtsai, 2001) a paradicsom szempontjából legfontosabb aktív BR származéknak tekintett kasztaszteront hozza létre (Yokota 1997; Bishop és mtsai, 1999). A hajtáscsúcs régiójára lokalizálható BR C-6 oxidáz aktivitást valószínűsített az is, hogy paradicsomban a *Dwarf* indukciót a levél differenciálódás egyik legkorábbi indikátorának találták (Pien és mtsai, 2001).

A hatékony BR transzport hiánya megerősíti azt a feltételezést, hogy a paradicsom intenzív *Dwarf* kifejeződést mutató régiói alapvetően megegyeznek az aktív BR bioszintézis helyeivel. A BR-ok alapvetően lokalizált hatását mutatta az is, hogy a paradicsom levelében *Dwarf/dwarf* genetikai mozaikosság folytán ráncos, BR-deficiens szektorok alakulhatnak ki (Bishop és mtsai, 1996). Az általunk paradicsomon és a Symons és Reid (2004) által borsón elvégzett reciprok oltási kísérletek eredményei egyaránt a BR-ok növényen belüli érdemi mozgásának hiányát jelezték mind akro-, mind bazipetális irányban.

A fejlődő termések hisztokémiai vizsgálatakor igen erős festődést kaptunk a fejlődő magok környékén a placentális régióban. Tekintettel arra, hogy a termés ezen részének pH-ja alacsonyabb a perikarpiuménál, ennek lehetséges befolyásoló hatását kiküszöbölendő, a GUS festést töményebb, nagyobb kapacitású pufferben is elvégeztük. Ennek azonos eredménye alapján megállapítható volt, hogy az észlelt különbség nem az eltérő pH következménye, hanem valóban a transzkriptum szintjén is tapasztalt intenzív expresszióból ered.

Munkánk meglepő eredménye volt, hogy a fejlődő termésben nagy mennyiségű BL-ot tudtunk kimutatni. Korábban úgy tartották, hogy ez a kasztaszteronnál aktívabb BR forma paradicsomban nem fordul elő, mert a vegetatív szervekben nem volt kimutatható sem vad típusú (Yokota 1997; Nomura és mtsai, 2001), sem Dwarf-túltermelő (Bishop és mtsai, 1999) vagy a bioszintézis visszacsatolásos szabályozásától mentes BR-inszenzitív (Montoya és mtsai, 2002) növények esetében. Ez azt sugallta, hogy a BL fontos szerepet játszhat a termés fejlődésében. Valószínűsíthető volt, hogy a Dwarf/CY85 erőteljes kifejeződése a termésben jelentősen hozzájárul a BL szintézis felfutásához. De tekintettel arra, hogy a Dwarf esetében *in vitro* csak kasztaszteront termelő C-6 oxidáz aktivitást lehetett kimutatni (Bishop és mtsai, 1999), a BL létrejöttéhez szükségesnek látszott egy további, termésspecifikusan expresszálódó enzim is. Nem sokkal később sikerült is azonosítani egy második, CYP85A3-nak elnevezett CYP85 enzimet (Nomura és mtsai, 2005), amely kizárólag a termésben található. Ez az *Arabidopsis* CYP85A2-höz hasonlóan a
C-6 oxidáz funkció mellett a BL képződéshez szükséges laktamáz aktivitással is rendelkezik.

Eredményeink azt mutatták, hogy a *Dwarf* aktivitása - az *Arabidopsis* BRbioszintetikus P450 génjeihez hasonlóan - BR-függő negatív visszacsatolásos szabályozás alatt áll. Felmerült a kérdés, hogy ez a gén miként fejeződhet ki a fejlődő termésben észlelt jelentős BL felhalmozódás ellenére. Feltételezhető, hogy a placenta környékére az analitikai adatok alapján kalkulálható mintegy 5 nM aktív BR koncentráció csak részleges gátlást eredményez. Az *Arabidopsis CPD* ilyen hormonszint mellett a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva még kb. 25%-os expressziót mutatott (saját adatunk). Másrészt az is elképzelhető, hogy a placentában - a jobb hatékonyság érdekében - a BR szintézis és felhalmozás térben elkülönülten, kompartmentalizálva történik.

#### 4.2.5. A BR bioszintézis napszakos regulációja

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: Bancos S, Szatmári A-M, 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]

A BR bioszintézis folyamán membrán szterolokból kiindulva számos, jórészt P450-ek által katalizált oxidáción keresztül képződik BL. Alaposabb vizsgálatok révén ismertté vált, hogy a szintézis reakciói a CYP85 és CYP90 enzimek relaxált szubsztrát-specificitása folytán párhuzamos ágakon haladhatnak (Choi és mtsai, 1997; Fujioka és mtsai, 2002), aminek következtében a konverziós lépések nem lineárisan, hanem inkább hálózatszerűen rendeződnek (Shimada és mtsai, 2003; Fujioka és Yokota, 2003). A szintézis ilyen szerveződése mellett lehetséges, hogy egyes szervekben, szövetekben a BL képződés sebességét különböző reakciók limitálhassák. Az intermedierek kétszikű fajokban meghatározott mennyiségei alapján ilyen szabályozás a körülményektől függően a C-23 hidroxiláció vagy C-6 oxidáció szintjén történhet (Nomura és mtsai, 2001).

Arabidopsisban a BR C-23 hidroxilációban és C-6 oxidációban a CPD/CYP90A1 és CYP85A2 enzimeknek van jelentős szerepük. Kifejeződésük elsődlegesen transzkripciós szabályozás alatt áll, amelynek összetettségét RT-PCR alapú mRNS-szint meghatározások (saját adataink; Shimada és mtsai, 2003) és promóter-riporter fúziós transzgénekkel végzett expressziós vizsgálatok (saját adataink) is mutatták. Azért, hogy a *CPD* és *CYP85A2* aktivitását még érzékenyebben, és főleg *in vivo* változásaik folyamán is nyomon követhessük, a korábban *GUS* 

fúziókhoz használt promóter régióikat a szentjánosbogár luciferáz génjével (*LUC*) fuzionáltattuk, majd ezekkel a riporter konstrukciókkal stabil transzformáns növényeket hoztunk létre. Az így kapott vonalak előzetes karakterizálása során azt tapasztaltuk, hogy mindkét promóter esetében a fúziós transzgén kifejeződése napszakoktól függően jelentősen változott.

Vizsgálataink célja a BR-bioszintetikus gének, mindenekelőtt a *CPD* napszakos kifejeződét meghatározó tényezők megismerése volt. Fel kívántuk deríteni a fény pontos szabályozó szerepét a diurnális szabályozásban, és azt is, hogy ennek közvetítésében mely szignálátviteli mechanizmusoknak vesznek részt. Tisztázni akartuk továbbá a transzkripció napszakos fluktuációjának esetleges hatását a biológiailag aktív BR formák felhalmozódására.

#### 4.2.5.1. A BR-bioszintetikus gének diurnális ciklusú kifejeződése

A napszakos változások természetét tisztázandó megvizsgáltuk a riporter fúziók időbeni kifejeződését egyhetes csíranövényekben LD viszonyok mellett. A *CPD:LUC* transzgén expressziója jellegzetes bifázisos görbét adott, amelynek két határozott maximuma a fény szakasz kezdete utáni első, és az annak végével egybeeső időpontra esett (43. ábra A). Ugyanilyen körülmények közt a *CYP85A2:LUC* igen hasonló működést mutatott (43. ábra B). Érdemi különbség volt viszont a *CYP85A2* promóternek a *CPD*-énél lényegesen alacsonyabb (mintegy 10%-ányi) aktivitása. A *CYP85A2* promóter kifejeződésében emellett jóval nagyobb napi amplitúdót lehetett megfigyelni, és a fény szakaszok kezdete utáni maximumok elérése a *CPD*-hez viszonyítva hosszabb időt: négytől hat órát vett igénybe (43. ábra A és B). Mindezek ellenére a két BR bioszintézis gén napi expressziós profiljának nyilvánvaló hasonlósága arra utalt, hogy kialakulásukban közös szabályozási mechanizmusok vehetnek részt.

Annak ellenőrzésére, hogy a mért lumineszcencia adatok mennyire híven tükrözik a tényleges *CPD* transzkripció mértékét, RT-PCR segítségével összehasonlítottuk a *CPD* mRNS stacioner mennyiségének változásait egy LD ciklus folyamán (43. ábra C). Hatóránkénti mintavétel mellett a transzkriptum szintje a sötét szakasz végén volt legalacsonyabb, a világos periódus végén legmagasabb, míg a két fényszakasz alatt köztes értékeket adott. Ezek az adatok jó egyezést mutattak a *CPD* promóter LUC aktivitás alapján mért kifejeződési értékeivel (43. ábra A).



### 43. ábra: A CPD és CYP85A2 gének diurnális kifejeződése

A és B: LD viszonyok közt nevelt *CPD:LUC* (A) és *CYP85A2:LUC* (B) transzgenikus csíranövényeknek a csírázástól számított nyolcadik naptól mért lumineszcencia értékei. Az idő tengelyen a fekete és fehér sávok a sötét és világos periódusokat jelzik, a nulla időpont a nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Egy-egy reprezentatív kísérlet adatai. C: LD viszonyok közt nevelt Col-0 csíranövények RNS mintáiból nyert *CPD*- és *UBQ10*-specifikus RT-PCR termékek autoradiogramja. A nulla időpont a kilencedik fényszakasz kezdete. Az *UBQ10* minták konstitutív kontrollként szerepelnek.

# 4.2.5.2. A CPD expresszió fény általi és cirkadián szabályozása

A *CPD* LD körülmények közt észlelt expressziós görbéjén a fény és sötét periódusok kezdetét követően markáns aktivitás változások voltak megfigyelhetők (43. ábra A). Ez arra utalt, hogy a fénynek közvetlen szabályozó szerepe lehet a transzkripciós szabályozásban. Ennek a feltevésnek az ellenőrzése céljából megvizsgáltuk LD viszonyok között kondicionált *CPD:LUC* csíranövények lumineszcenciájának időbeni változásait konstans fényviszonyok között is. Ennek

során LL körülmények között a lumineszcencia értékek szabályos, nagyjából 24 órás ciklusokat mutató oszcillációját észleltük, amely a folyamatos fény szakasz kezdetétől több napon keresztül fennmaradt (44. ábra A). A cirkadián kifejeződési görbe minimumai a relatív nappalok (a LD kondicionálás során a fényperiódusoknak megfelelő időszak), míg maximumai a relatív éjszakák közepére estek. Bár a négy napig tartó mérés során az expresszió szintje lassan, egyenletesen csökkent, ciklusainak a minimumokhoz viszonyított amplitúdója végig nagyjából kétszeres maradt. A cirkadián kifejeződés jól megfigyelhető volt DD körülmények között is, ahol a ciklusok periódushossza, valamint maximum és minimum értékeinek időpontjai megegyeztek a LL viszonyok mellett észleltekével. Szembetűnő különbség volt viszont, hogy a DD mérés során az expresszió szintje gyorsan csökkent, ami egyre kisebb cirkadián amplitúdóhoz, végül pedig a ciklusok eltűnéséhez vezetett a mérés negyedik napjára (44. ábra B).



44. ábra: A *CPD* expresszió cirkadián szabályozása állandó fényviszonyok mellett *CPD:LUC* csíranövényeken hét nap LD kondicionálást követően LL (A) és DD (B) viszonyok mellett mért lumineszcencia értékei. Az időskála az utolsó (nyolcadik) fényszakasz kezdetétől mért ún. "zeitgeber" időt (ZT) mutatja, a fekete és fehér sávok a sötét és világos időszakokat jelzik. Egy-egy reprezentatív kísérlet adatai.

A CPD diurnális (LD) és cirkadián (pl. LL) kifejeződését összehasonlítva jól megfigyelhető az aktivitási minimumok egybeesése a LD görbe fény, és a LL görbe

szubjektív nappal szakaszainak közepén, valamint a LD görbe sötét időszakának válla és a LL ciklusok szubjektív éjszakákra eső lecsengése közti hasonlóság (43. ábra A, 44. ábra A). Diurnális viszonyok mellett a cirkadián alapexpresszió szintje a fény időszak kezdetén erősen megnő, majd annak végén hasonló mértékben lecsökken, jelezve a fény pozitív szabályozó szerepét. Eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a *CPD* diurnális kifejeződési profilját egymásra épülő kettős, fényfüggő és diurnális szabályozás határozza meg.

### 4.2.5.3. A CPD gén fényregulációja fitokróm jelátvitelt igényel

Mivel úgy találtuk, hogy a fénynek fontos szerepe van a *CPD* expresszió szabályozásában, meg kívántuk határozni, hogy a növényi fotoreceptorok, ill. a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli utak közül melyek vesznek részt a fényindukció kialakulásában. Vizsgálataink során első közelítésben arra voltunk kíváncsiak, hogy a látható fény spektrumának mely tartományai alkalmasak a fényválasz létrehozására.



45. ábra: A hullámhossz hatása a *CPD* fényindukciójára Hét nap LD kondicionálást követően további fehér fény/sötét (LD), vörös fény/sötét (RD), vagy kék fény/sötét (BD) fotoperiódusban nevelt *CPD:LUC* csíranövények lumineszcencia értékei. Az idő tengelyen a fekete és fehér sávok a sötét és világos periódusokat jelzik, a nulla időpont a nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Egy reprezentatív kísérlet adatai.

Kísérletünkben egyhetes, LD kondicionált *CPD:LUC* csíranövények mintáit a nyolcadik sötét periódus végétől kezdődően vörös/sötét, kék/sötét, vagy változatlan LD ciklusokban neveltünk tovább. A vörös és kék megvilágítást a fitokróm, ill. kriptokróm fotoreceptorok specifikus aktiválására alkalmas monokromatikus fényforrásokkal biztosítottuk, a LD kezelésével megegyező fotoperiódusokat alkalmazva. A *CPD* 

vörös/sötét ciklusokban mért expressziós profilja a LD görbével együtt haladt (45. ábra), ami azt mutatta, hogy a vörös fény önmagában elegendő a fényszabályozás fenntartásához. Kék/sötét periódusok mellett viszont a kifejeződési szint, és ezzel együtt a fényválaszok erőteljes csökkenését tapasztaltuk (45. ábra). A kék/sötét ciklusok során észlelt, a DD körülményekéhez hasonlóan lecsengő kifejeződés a kék hullámhossz tartománynak a *CPD* fényszabályozásában betöltött alárendelt szerepére utalt.

A vörös fénynek a *CPD* diurnális szabályozásában játszott kitüntetett szerepéből arra lehetett következtetni, hogy a fényválasz kialakításában a fitokrómoknak, illetve a róluk kiinduló szignálutaknak meghatározó jelentősége van. E feltevés ellenőrzésére megvizsgáltuk a *CPD:LUC* transzgén napszakos kifejeződését fitokróm A- és B-deficiens kettős mutáns háttérben is, feltételezve hogy a két legabundánsabb fitokróm forma hiánya jól felismerhető expressziós különbséget eredményezhet.



46. ábra: A *CPD* diumális kifejeződése fitokróm-deficiens mutáns háttérben A és B: LD viszonyok közt nevelt, vad típusú (Col-0; W) vagy *phyA-201phyB-5* (*phyAphyB*) hátterű *CPD:LUC* csíranövények nyolcadik naptól mért lumineszcenciájának azonos mérési sorozatból származó abszolút (A) és normalizált (B) értékei. Az idő tengelyen a fekete és fehér sávok a sötét és világos periódusokat jelzik, a nulla időpont a nyolcadik fényszakasz kezdetének felel meg. Egy reprezentatív kísérlet adatai.

A *CPD:LUC* aktivitásának változásait vad, ill. *phyAphyB* hátterű transzgenikus csíranövényekben párhuzamosan mértük LD körülmények között. Ennek során a fitokróm-deficiens növényekben az expresszió szintje a vad típusénál jóval alacsonyabb volt (46. ábra A), és a mutáns háttérben létrehozott valamennyi független transzformáns vonalban annak 10-25%-a között mozgott (nem bemutatott adatok). Emellett lényegesen eltérő volt a kifejeződési görbék lefutása is, amennyiben fitokróm-deficiens háttérben a fény és sötét szakaszok határánál az aktivitási szintek csak igen kismértékű változást mutattak, ami által a LD expressziós profilon alapvetően a *CPD* aktivitás maximuma sötét periódusok közepére esett (46. ábra A, B). Mindebből arra következtethettünk, hogy a fitokrómoknak (és ezeken belül is valószínűleg a zöld növényekben legfontosabb fitokróm B-nek) meghatározó szerepe van a *CPD* gén transzkripciójának szabályozásában. Ez egyrészt az expresszió alapszintjének beállításában, másrészt a fényviszonyok változására adott válasz kialakításában nyilvánul meg.

## 4.2.5.4. A CPD aktivitás diurnális ciklusa független a BR szabályozástól

Korábbi munkája nyomán ismert volt, hogy a *CPD* gén kifejeződését a BR bioszintézis során keletkező aktív hormon a transzkripció szintjén gátolja. Várható volt, hogy amennyiben a *CPD* kifejeződés mértéke kihat a BR szintézisre és felhalmozódásra, ez visszahat az expresszióra a végtermékgátlásos szabályozás révén. Ezért tisztázni akartuk a BR-ok esetleges hatását a *CPD* napi kifejeződésére, különös tekintettel arra a lehetőségre, hogy a diurnális változások esetleg nem közvetlen szabályozás révén, hanem esetleg a fény és cirkadián faktorok által előidézett napszakos BR-szint különbségek következtében jönnek létre.

A végtermékgátlásos szabályozás a BRI1 BR receptor közvetítésével valósul meg, ezért ennek hiánya a *bri1-101* funkcióvesztéses mutánsban jól tanulmányozható. Megvizsgáltuk tehát a *CPD:LUC* napszakos aktivitását *bri1* hátterű transzgenikus csíranövényekben LD, LL, ill. DD nevelési viszonyok mellett (47. ábra). A *bri1* növények BR-inszenzitivitásából adódóan ezekben a végtermékgátlás nem érvényesül, így a fényviszonyoktól függetlenül a vad típusú kontrolléhoz viszonyítva mintegy kétszeres kifejeződési szintet észleltünk.

A vad típusú, ill. bri1 háttérben mért LD expressziós görbék - az abszolút aktivitási értékek különbsége ellenére - hasonlóak voltak, ugyanakkor lefutásukban

bizonyos különbségeket is látni lehetett (47. ábra A). A BR-inszenzitív növényekben a fényviszonyok változására adott válaszok kialakulása hosszabb időt vett igénybe, és a fény szakasz kezdetének expressziós maximuma határozottan kisebb volt a sötét periódus kezdete előttinél. Mindezekből az látszott, hogy bár a *CPD* gén diurnális regulációja alapvetően független a BR-visszacsatolásos szabályozástól, ám utóbbi



47. ábra: A BR-inszenzitivitás hatása a *CPD* diurnális és cirkadián expressziójára A, B és C: Vad típusú (Col-0; W) vagy *bri1-101* (*bri1*) hátterű *CPD:LUC* csíranövényeken a nyolcadik fényszakasz kezdetét követő 12. órától (A), vagy hét nap LD kondicionálást követően LL (B) és DD (C) viszonyok mellett mért lumineszcencia értékek. Az időskála a nyolcadik fényszakasz kezdetétől mért időt (A), ill. az ún. "zeitgeber" időt (ZT; A és B) mutatja, a fekete és fehér sávok a sötét és világos időszakokat jelzik. Egy-egy reprezentatív kísérlet adatai.

mégis befolyásolja az expressziós profil kialakulását. A cirkadián szabályozottságot mutató állandó fényviszonyok esetében a LL kifejeződésben nem tapasztaltunk érdemi különbséget (47. ábra B). Figyelemre méltó eltérést mutatott ugyanakkor a vad típusú, ill. *bri1* háttérben kapott DD expressziós görbe, amennyiben az utóbbi lefutása a LL profilhoz hasonló volt, és a vad hátterűével ellentétben nem mutatta a *CPD* aktivitás tartós sötét hatásra bekövetkező csökkenését (47. ábra C). Ez a meglepő eredmény arra utalt, hogy a génaktivitás sötétben bekövetkező repressziójában a BR szignálnak fontos szerepe van.

### 4.2.5.5. A növények BR tartalmának napszakos változása

A CPD és CYP85A2 gének expressziójának diurnális változásai alapján feltételezhető volt, hogy ezek hatásaként a növények aktív BR tartalma is napszakos ingadozást mutathat. Ennek tisztázása céljából GC-MS analízis segítségével meghatároztuk az egyhetes csíranövények endogén BR-ok mennyiségének alakulását egy 24 órás LD ciklus során, a fény szakasz kezdete előtt, annak közepén, a sötét szakasz kezdete előtt, ill. annak közepén (0, 6, 12, ill. 18 h) vett mintákban (8. táblázat). Ezen vizsgálatok során az ún. korai C-6 oxidációs út intermediereit (kataszteron, teaszteron, 3-dehidroteaszteron és tifaszterol) alacsony (< 10 ng/kg) szintjük miatt nem lehetett detektálni. A késői C-6 oxidációs út intermedierei jól kimutathatók voltak, ugyanakkor mennyiségükben érdemi eltérések nem voltak észlelhetők a LD ciklus során. Meglepő módon viszont erős BL felhalmozódást tapasztaltunk a fény periódus közepén, noha ez a BR forma a másik három mérési időpontban nem volt kimutatható. Ez a változás az aktív BR-ok szintjének jelentős felszaporodását eredményezte, ugyanakkor ennek során az intermedier poolok alapvetően állandóak maradtak (8. táblázat).

A csíranövények sötétben tapasztalható megnyúlása alapján logikusnak tűnt az a feltételezés, hogy a növények aktív BR tartalma a sötét időszakok során megnő (Ma és mtsai, 2001). Erre utaltak azok az eredményeink is, hogy DD körülmények közt a *CPD* expresszió a BR végtermékgátlás révén represszálódik (47. ábra C). Ezzel szemben a BR-bioszintetikus *CPD* és *CYP85A2* gének egyértelműen fényindukáltnak bizonyultak, és LD viszonyok közt az endogén hormontartalom nem a sötét, hanem a fény időszakok során mutatott emelkedést. Ennek az ellentmondásnak a tisztázása céljából megvizsgáltuk, hogy miként alakul a BR tartalom DD viszonyok közt. Eredményeink azt mutatták, hogy kétnapos DD kezelést követően a *CPD* expresszió szintje az eredetinek mintegy 20%-ára csökken. Ezért a hormonszint vizsgálatakor egyhetes, LD fotoperiódusok mellett növesztett csíranövény minták egyikét a 8. fény periódus végétől 48 órára folyamatos sötétbe helyeztük, míg ezek kontrollját ugyanennyi ideig LD-ban neveltük tovább. Ezt követően GC-MS analízissel határoztuk meg a növényekben az endogén BR-ok mennyiségét. Eredményeink szerint

#### 8. táblázat: A BR tartalom napszakos változása egyhetes csíranövényekben

Az egyes időpontoknak megfelelő BR adatok három független analízisből származnak, melyeket 95 g, 83 g, 80 g, ill. 98 g (első sorok), 37 g, 32 g, 40 g, ill. 31 g (második sorok), valamint 40 g, 36 g, 40 g, ill. 37 g (harmadik sorok) friss növényből kiindulva végeztek.

	BR tartalom (ng kg <sup>-1</sup> friss tömeg)					
BR	a fényszakasz kezdetétől mért idő (h)					
	0	6	12	18		
brasszinolid	ND	151	ND	ND		
	ND	136	ND	ND		
kasztaszteron	47	45	38	46		
	72 73	83 84	75 83	64 64		
6-dezoxokasztaszteron	1237	1379	1470	1422		
	1114 1196	1152 1156	1044 1178	1242 1239		
6-dezoxotifaszterol	445	491	438	420		
	496 740	495 412	527 584	548 653		
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	192	232	205	223		
	287 276	275 318	270 269	324 434		
6-dezoxoteaszteron	68	71	87	66		
	182 80	71 70	98 111	77 79		
6-dezoxokataszteron	1394	1689	1638	1346		
	2124 2779	1819 1856	1661 1554	1756 1590		
	2115	1000	1007	1000		

ND: nem detektált.

az egyedüli kimutatható bioaktív BR, a kasztaszteron szintje a tartós sötét hatására érdemben nem változott, és a többi intermedier mennyisége is lényegében azonos maradt (9. táblázat). Ez azt mutatta, hogy a *CPD* sötétbeni, BR-mediált repressziója nem lehet a megemelkedett hormonszint következménye.

### 9. táblázat: Tartós sötét kezelés hatása az endogén BR-ok szintjére

Az egyes időpontoknak megfelelő BR adatok három független analízisből származnak, amelyeket 125 g, ill. 132 g (első sorok), 87 g, ill. 109 g (második sorok), valamint 101 g, ill. 100 g (harmadik sorok) friss növényből kiindulva végeztek.

	BR tartalom (ng	g kg <sup>-1</sup> friss tömeg)
BR	48 h DD	LD kontroll
brasszinolid	ND ND ND	ND ND ND
kasztaszteron	79 63 55	85 54 65
6-dezoxokasztaszteron	531 802 891	977 905 1032
6-dezoxotifaszterol	387 nd nd	521 79 155
3-dehidro-6-dezoxoteaszteron	192 188 220	201 182 182
6-dezoxoteaszteron	52 143 120	49 99 114
6-dezoxokataszteron	1405 887 1336	1608 1356 2198

ND: nem detektált.

4.2.5.6. Folyamatos sötét kezelés fokozott BR-érzékenységet eredményez

Megfigyelésünk, miszerint a *CPD* kifejeződés sötétbeni BR-visszacsatolásos repressziója nem jár együtt az endogén hormonszint megnövekedésével azt sugallta,



48. ábra: A BR-visszacsatolásos szabályozás szerepe a *CPD* sötét repressziójában A: 100 nM BR kezelés hatása a *LUC* expressziójára vad hátterű egyhetes *CPD:LUC* és *mCPD:LUC* csíranövényekben. A *LUC* próbával végzett Northern-hibridizáció autoradiogramja (felül), és az etidium-bromiddal festett hibridizációs membrán (alul). B és C: LD-kondicionált *CPD:LUC* és *mCPD:LUC* csíranövények lumineszcenciájának azonos mérési sorozatból származó abszolút (A) és normalizált (B) értékei a LD  $\rightarrow$  DD átmenet során. Az időskála a nyolcadik fényszakasz kezdetétől mért időt mutatja, a fekete és fehér sávok a sötét és világos időszakokat jelzik. Egy reprezentatív kísérlet adatai.

hogy a fény valamilyen módon befolyásolhatja a növények hormonérzékenységét. Ezt a lehetőséget ellenőrizendő megvizsgáltuk, hogy DD körülmények közt az expresszió csökkenése valóban a BZR1 transzkripciós faktor által mediált hormonális BR regulációnak köszönhető-e. Kísérleteinkhez olyan riporter konstrukciót állítottunk elő, amelyben a *CPD* promóter BRRE szabályozó szekvencia-motívumának egyetlen nukleotidát érintő mutációjával lehetetlenné válik a BZR1 kötődése (He és mtsai, 2005). Az így kapott *mCPD:LUC* fúzióval, amely a transzlációs starthelyhez viszonyított -80-as helyzetű G  $\rightarrow$  A tranzíciótól eltekintve megegyezett a *CPD:LUC* konstrukcióval, transzgenikus növényeket hoztunk létre. Ezekben *LUC* próbával végzett Northern-blot hibridizációval a *CPD:LUC* kontrollénál közel tízszer magasabb mRNS-szintet tudtunk kimutatni, és ez - a kontrollal ellentétben - külső BL kezeléssel nem volt befolyásolható (48. ábra A).

Miután igazoltuk, hogy *mCPD:LUC* növényekben nem érvényesül a transzkripció BR-függő szabályozása, CCD kamerás méréssel meghatároztuk az expresszió szintjének alakulását DD körülmények között. Az *mCPD:LUC* konstrukció a várt módon a *CPD:LUC*-nál erősebb kifejeződést mutatott, ugyanakkor DD körülmények közt aktivitása kevésbé represszálódott, és görbéjén a cirkadián oszcilláció még a harmadik napon is jól felismerhető volt (48. ábra B és C). Ez a kifejeződési mintázat igen hasonló volt a *CPD:LUC* BR-inszenzitív háttérben kapott expressziós profiljához (47. ábra). Ez egyrészt megerősítette, hogy a BRRE elem mutációja folytán az *mCPD* promóter elvesztette BR szabályozhatóságát, másrészt igazolta azt a feltevésünket, hogy a *CPD* aktivitás sötétbeni repressziója elsődlegesen hormonális hatás következménye. Mivel a represszió sötétben változatlan aktív BR-szint mellett alakult ki, mindez a tartós sötétben nevelt csíranövények BR-érzékenységének fokozódását mutatta.

### 4.2.5.7. A BR bioszintézis napszakos szabályozottságának jelentősége

A biológiailag aktív BR-ok fiziológiás szintjének kialakításában fontos szerepe van *de novo* szintézisük szabályozásának. Erre vonatkozóan értékes adatok voltak nyerhetők a bioszintetikus gének promótereiből és riporter génekből létrehozott fúziók expressziójának tanulmányozása révén. Az *in vivo* analíziseink során használt *CPD:LUC* transzgén egyrészt a *CPD* viszonylag erős kifejeződése (Shimada és mtsai, 2003) és fontos szerepe, másrészt a riporter kellően rövid, nagyjából két órás féléletideje (Millar és mtsai, 1992b) miatt tűnt ideálisnak. A LUC aktivitás alapján kapott transzkripciós adatok megbízhatóságát mutatta jó egyezésük a CPD mRNS mennyiségi változásaival saját RT-PCR analízisünkben, valamint egy, a diurnális kifejeződés detektálására létrehozott cDNS "microarray" hibridizációs adataival is (Schaeffer és mtsai, 2001 kiegészítő adatok: genome-www.stanford.edu/microarray). Vizsgálataink szerint a CPD a nap folyamán bifázisos, fény és cirkadián ritmus által együttesen meghatározott kifejeződést mutat. A CYP85A2 esetében kapott hasonló expressziós profil e két kulcsfontosságú BR-bioszintetikus gén összehangolt napszakos szabályozására utal. Bár a CYP85A2 aktivitás diurnális amplitúdója a CPDénél erőteljesebb regulációt jelzett, ennek részletesebb tanulmányozása a mintegy kifejeződési szint (www.genevestigator.ethz.ch) tízszer alacsonyabb miatt nehézségekbe ütközött.

A *CPD*-nek a szubjektív éjszaka közepén maximumot adó cirkadián expressziója fényben több napon át fennmaradt, de sötétben két nap után lecsengett. A ciklusok amplitúdója összemérhető volt az *Arabidopsis* más cirkadián génjeinek esetében tapasztaltakkal (Harmer és mtsai, 2000), és a diurnális oszcilláció mértékével is. Azt tapasztaltuk, hogy mind a fény általi, mind a cirkadián szabályozás fennmarad BR-inszenzitív növényekben is, ami a hormonális és diurnális reguláció függetlenségét mutatta. Tekintettel arra, hogy a *CPD* és *CYP85A2* promóterében is megtalálható a CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED PROTEIN 1 (CCA1) transzkripciós faktort kötni képes AAAATCT szekvencia elem, elképzelhető, hogy ez szerephez jut a napszakos kontroll kialakításában. A CCA1-ről ismert, hogy mind pozitív, mind negatív transzkripciós komplexekben részt vehet a cirkadián szabályozásban (Harmer és Kay, 2005), és emellett fontos eleme a fitokróm-mediált fényregulációs szignálútnak is (Green és Tobin, 1999).

Zöld *Arabidopsis* csíranövényekben az öt fitokróm forma közül a PHYB szintje a legmagasabb, míg a PHYA-é a legalacsonyabb (Sharrock és Clack, 2002). Ennek alapján a *phyaphyb* kettős mutánsban a *CPD* fényindukálhatóságának drasztikus csökkenése a PHYB-n keresztüli szabályozás meghatározó voltára utal. A hormonszintézis fény általi regulációját részletesen vizsgálták a gibberellinek esetében is, ahol a bioszintetikus gének többsége szintén hullámhossz-, ill. fotoreceptor-specifikus módon szabályozódott. *Arabidopsis*ban, salátában (*Lactuca sativa*) és borsóban a GA 3β-hidroxiláz és 20-oxidáz izoenzimeinek génjeinek transzkripcióját részben fitokróm-függőnek, részben ettől függetlennek találták (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998; Ait-Ali és mtsai, 2000).

Az élettani folyamatok fényszabályozásának fontos résztvevői a fitohormonok, és ennek kapcsán több példa is ismert a *de novo* hormonszintézis közvetlen szerepére. Például az Arabidopsis és saláta magok csírázásához szükséges gibberellin felhalmozódás a GA 3β-hidroxilázok fény általi indukciójának a következménye (Toyomasu és mtsai, 1998; Yamaguchi és mtsai, 1998). Alabadí és mtsai (2004) kimutatták, hogy a gibberellin szintézis hiánya vagy gátlása a sötét morfogenezis zavarához, és ezáltal a fényszabályozott gének rendellenes kifejeződéséhez vezet. A gibberellin szintézis paklobutrazolos gátlása pedig a növény árnyékkerülő reakciójának kialakulását akadályozta (Pierik és mtsai, 2004).

A BR anyagcsere és a fény közti kapcsolatról viszonylag kevés adat állt rendelkezésre. Choe és mtsai (2001) magasabb BR-szintet mutattak ki fényben nőtt, és alacsonyabbat etiolált *Arabidopsis*ban, bár a minták különböző korú növényeket tartalmaztak. A BR szintézis fényfüggését meggyőzőbben támasztotta alá az, hogy fényben nevelt borsó csíranövényekben az etiolált kontrollhoz viszonyítva 17-szer magasabb BL, és négyszer nagyobb kasztaszteronszintet lehetett kimutatni (Symons és mtsai, 2002). A BR-okat inaktiváló CYP734A1-et és CYP72C1-et kódoló génekről kimutatták, hogy expressziójukat a fény gátolja (Turk és mtsai, 2003; Takahashi N és mtsai, 2005), ami a bioszintetikus génekkel összehangolt működést tesz lehetővé. Fényben a *CYP85A2* indukált, és a *CYP734A1* valamint *CYP72C1* represszált kifejeződése összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a napi ciklus folyamán a fény szakaszban átmeneti BL felhalmozódás volt tapasztalható.

Arabidopsisban a hipokotil-elongáció cirkadián szabályozást mutat, a szubjektív delet mintegy öt órával követő maximummal (Dowson-Day és Millar, 1999), amivel egybeesik számos megnyúlásért felelős gén összehangolt cirkadián indukciója (Harmer és mtsai, 2000). Így nem meglepő, hogy a cirkadián szabályozást érintő mutációk általában rendellenes növekedéshez is vezetnek (Dowson-Day és Millar, 1999). A cirkadián óra alapelemét kódoló *TOC1* mutációja esetében kimutatható volt, hogy az az egyik GA 20-oxidázt kódoló *GA5* gén fokozott kifejeződéséhez vezet (Blázquez és mtsai, 2002). Burgonyában a *StGA20ox1* és *StGA20ox2* gének komplex, bifázisos diurnális expressziója (Carrera és mtsai, 1999; Jackson és mtsai, 2000) is cirkadián típusú reguláltságra utal, amit tovább valószínűsít a bioaktív gibberellin formák felhalmozódásának ilyen jellegű fluktuációja (Foster és Morgan, 1995). Az indol-3-ecetsav felhalmozódásában és az etilén kibocsátásban tapasztalt cirkadián periodicitás is azt mutatja, hogy a fitohormon-szintézis napszakos szabályozása a növények megfelelő fejlődésének egyik fontos feltétele. Ezt megerősíti, hogy újabban

hat fitohormon-csoport bioszintéziséhez és szignálátviteléhez kapcsolódó közel 200 gén napszakos kifejeződésének vizsgálata alapján azonosítani tudtak egy olyan közös transzkripciós szabályozó elemet, amely elégséges ezen gének koordinált, a hipokotil megnyúlásával összehangolt cirkadián indukciójához (Michael és mtsai, 2008).

A BR-bioszintetikus gének cirkadián szabályozására vonatkozó adatainkat megerősítik az *Arabidopsis* P450 gének napszakos szabályozásával kapcsolatos legújabb vizsgálatok eredményei. Ezek során Pan és mtsai (2009) azt találták, hogy a BR-bioszintetikus enzimek közül a CYP85A2 és sebesség-meghatározónak tekintett CYP90A1/CPD mellett a CYP90B1/DWF4 és CP90C1/ROT3 is cirkadián kifejeződést mutat. Az azonos fázis szerint szabályozott bioszintetikus gének mellett érdekes módon ugyanilyen időzítéssel expresszálódik a szintén cirkadián kontroll alatt álló *CYP734A1*, amely az inaktivációért felelős enzimek egyikét kódolja (Pan és mtsai, 2009).

Eredményeink azt mutatták, hogy a *CPD* gén sötétben BR szabályozás révén represszálódik. Mivel ez nem járt együtt a növények aktív BR tartalmának növekedésével, az expresszió gátlása a hormonérzékenység sötétbeni fokozódásának tulajdonítható. Ez összhangban áll azzal, hogy néhány munkacsoport BR kezelések kapcsán a zöld csíranövényeknek az etioláltakénál gyengébb reakcióiról számoltak be (Fujioka és mtsai, 1997; Choe és mtsai, 1998; Yang XH és mtsai, 2005) Említésre érdemes, hogy hasonló sötét szenzitizálódást a szintén növekedés-serkentő gibberellinek esetében is meg lehetett figyelni (Reed és mtsai, 1996).

A BR szintézis napszakos szabályozásának lehetséges élettani előnyei még nem tisztázottak, de feltételezhető, hogy szerepe van a növekedési és metabolikus funkciók periodikus változásainak megfelelő hormonszint kialakításában. A fény szakaszban tapasztalt *CPD* és *CYP85A2* indukció és BL felhalmozódás látszólag ellentmondásban van a hipokotil megnyúlásának lassulásával ebben az időszakban. A jelenség valószínűleg a BR-érzékenység fényfüggő változásaival magyarázható. Az eddigi adatok a BR-szint és -érzékenység összehangolt szabályozására utalnak, amelynek flexibilitását és adaptivitását fejlődés- és szervspecifikus reguláció biztosítja. A hormonszint kialakításában a *de novo* BR szintézis pontos szerepe még nem ismeret, de ennek fontosságát jelzi a bioszintetikus gének kifejeződésének komplex transzkripciós kontrollja.

Egy érdekes lehetőség, hogy a fény szakaszra eső BL felhalmozódás révén a diurnális szabályozás befolyásolhatja a virágzás idejét. Ismert volt a BR szintézis erős indukciója a reproduktív fejlődés során (saját adataink; Nomura és mtsai, 2005;

Symons és mtsai, 2006), ezért elképzelhetőnek tűnt, hogy a virágzás kiváltásában szerepe lehet a CYP85A2 fokozott fényindukciójának és az ebből adódó BL akkumulációnak hosszúnappalos viszonyok között. Ez egyrészt összhangban látszott lenni a BR-deficiens mutánsok későn virágzó fenotípusával (Chory és mtsai, 1991; saját adataink), másrészt gibberellinek esetében ismert volt a hormonszint GA 20oxidáz kifejeződésen keresztüli növelésének virágzást indukáló hatása hosszúnappalos megvilágítás mellett (Blázquez és mtsai, 2002; Lee és Zeevaart, 2002). A későbbiekben kimutatták, hogy az aktív BR formák felhalmozódása valóban fontos a virágzás indukciójához, amit a FLOWERING LOCUS C (FLC) represszor kifejeződésének gátlása útján segít (Domagalska és mtsai, 2007).

#### 4.3. A CYP90C1 és CYP90D1 enzimek bioszintetikus funkciója

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: Ohnishi T, Szatmári A-M, 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]

A biológiailag aktív BR formák oxigén tartalmú funkciós csoportokat hordoznak a szteroid váz C-2, C-3 és C-6 pozícióiban, valamint az oldallánc C-22 és C-23 atomjain (3. ábra). A C-3 hidroxil kivételével ezen szubsztituensek kialakításáért a CYP85 és CYP90 családokba tartozó P450 monooxigenázok felelősek (Fujioka és Yokota, 2003). Ezeknek az enzimeknek a funkcióit jórészt indirekt módszerekkel, BRdeficiens mutánsok endogén BR tartalmának analízise, vagy fenotípusuk intermedierekkel való menekíthetősége alapján határozták meg. Arabidopsisban ilyen módon bizonyult a CYP90A1/CPD C-23 (saját adataink), a CYP90B1/DWF4 pedig C-22 hidroxiláznak (Choe és mtsai, 1998). A BR-deficiens mutánsok vizsgálata során ugyanakkor problémát okozhat, hogy a BR szintézis nem lineáris reakcióláncban, hanem egy metabolikus hálózat mentén történik (Shimada és mtsai, 2001; Fujioka és mtsai, 2002; Katsumata és mtsai, 2008), és hogy a hormonális végtermékgátlás hiányában indukálódó enzimtúltermelés folytán fiziológiásan alárendelt konverziós lépések aktiválódhatnak (saját adataink; Goda és mtsai, 2002). Ezek a tényezők nagymértékben megnehezíthetik az analitikai és menekítési adatok egyértelmű interpretálását.

A BR-bioszintetikus P450-ek biokémiai jellemzésére először a paradicsom, *Arabidopsis* és rizs CYP85 enzimeinek esetében került sor, amikor előbb C-6 oxidáz (Bishop és mtsai, 1999; Shimada és mtsai, 2001 és 2003; Hong és mtsai, 2002), majd a CYP85A2 és CYP85A3 esetében BL-szintáz aktivitást is sikerült kimutatni (Nomura és mtsai, 2005; Kim TW és mtsai, 2005). Később *E. coli* sejtekben kifejeztetett *Arabidopsis* CYP90B1 C-22 hidroxiláz aktivitását is rekonstruálni lehetett *in vitro* körülmények között (Fujita és mtsai, 2006). Bár a heterológ rendszerben kifejeztetett enzimek révén megismerhetővé vált például a lehetséges szubsztrátokkal szembeni affinitásuk, technikai nehézségek miatt ezzel a módszerrel a CYP90 család más enzimei nem voltak vizsgálhatók.

A CYP90C1 és CYP90D1 monooxigenázok szerepe a BR szintézisben ismeretlen volt. A CYP90C1 gént inaktiváló rot3 mutáció csak nagyon enyhe levélmorfológiai fenotípust eredményezett (Kim GT és mtsai, 1998), a CYP90D1 hasonló mutációja esetében pedig morfológiai változást egyáltalán nem észleltek (Kim GT és mtsai, 2005). A mindkét funkcióban defektív kettős mutáns ugyanakkor tipikus BR-hiányos törpe növény volt (Kim GT és mtsai, 2005), ami a CYP90C1 és CYP90D1 enzimek funkcionális redundanciáját sugallta. Ezzel a várakozással ellentétben a rot3 és egy cyp90d1 nullmutáns BR komponenseinek GC-MS analízise alapján Kim GT és mtsai (2005) arra a következtetésre jutottak, hogy a CYP90C1 és CYP90D1 a BR különböző lépéseit katalizálja, anyagcsereút bár értelmezésük néhány ellentmondására maguk is felhívták a figyelmet. Munkájuk után számos fontos kérdés megválaszolatlan maradt, ezért a rendelkezésünkre álló eszközökkel mi is megvizsgáltuk e két P450 enzim szerepét.

Munkánk célja CYP90C1 és CYP90D1 enzimek szerepének egyértelmű tisztázása volt. Hiánymutánsok segítségével terveztük felderíteni az egyes aktivitások elvesztésének fenotipikus és metabolikus következményeit. Heterológ rendszerben kifejeztetett aktív CYP90C1 és CYP90D1 biokémiai karakterizálásával pedig az enzimek funkcióit és szubsztrát-preferenciáit kívántuk meghatározni.

# 4.3.1. CYP90C1- és CYP90D1-deficiens mutánsok

### 4.3.1.1. CYP90C1- és CYP90D1-hiányos mutánsok izolálása

A CYP90C1 és CYP90D1 funkciójának megismerése céljából olyan mutáns vonalakat izoláltunk, amelyekben ezen P450-ek génjei T-DNS inszerciót hordoznak. A *cyp90c1* és *cyp90d1* funkcióvesztéses mutánsokat a Koncz Csaba laboratóriumában (Max Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) létrehozott, 90000 T-DNS inszerciós *Arabidopsis* vonalból PCR alapú szűréssel azonosítottuk, T-DNS- és

génspecifikus primerek segítségével (Ríos és mtsai, 2002). A genomi régiók és a csatlakozó T-DNS szakaszok szekvenálása alapján a mutánsokban a T-DNS integrációja a *CYP90C1* 6. exonjában, a transzlációs start kodontól 3220 bp-ra, míg a *CYP90D1* esetében annak 3. és 4. exonja közt, a start kodontól 1596 bp-ra jött létre (49. ábra A). A homozigóta vonalak keresztezésével nyertük a *cyp90c1cyp90d1* dupla mutánst. A *cyp90c1, cyp90d1* és *cyp90c1cyp90d1* mutánsokból izolált RNS mintáinak RT-PCR analízisével igazolni lehetett a *CYP90C1*, ill. *CYP90D1* mRNS-ek hiányát (49. ábra B).

# 4.3.1.2. A mutáns vonalak fenotípusának jellemzése

A mutációk hatásának megismerése végett jellemeztük a *cyp90c1*, *cyp90d1* és *cyp90c1cyp90d1* növények fenotípusát. Várakozásunknak megfelelően a *cyp90c1* és *cyp90d1* mutációknak heterozigóta állapotban nem volt észlelhető morfológiai hatása a



49. ábra: A CYP90C1 és CYP90D1 géneket inaktiváló T-DNS inszerciók A: A CYP90C1 és CYP90D1 gének exon-intron szerkezete. Az exonok nukleotidákban kifejezett hosszát az őket jelölő szakaszokban szereplő számok mutatják. A nyilak a T-DNS inszerció helyét mutatják a *cyp90c1*, ill. *cyp90d1* mutánsokban. B: A CYP90C1, CYP90D1 és UBQ10 transzkriptumok RT-PCR-es kimutatása Col-0, *cyp90c1*, *cyp90d1* és *cyp90c1cyp90d1* csíranövények RNS mintáiból.

fejlődés egyetlen stádiumában sem. A *rot3*-ra vonatkozó korábbi adatoknak (Tsuge és mtsai, 1996; Kim GT és mtsai, 1998) megfelelően a *cyp90c1* csíranövények sziklevelei

valamelyest lekerekítettek voltak mind DD, mind LD körülmények közt (50. ábra B, F), az ugyanígy nevelt *cyp90d1* növénykék (50. ábra C, G) pedig nem voltak megkülönböztethetők a Col-0 kontrolltól (50. ábra A, E). Ezekkel ellentétben a *cyp90c1cyp90d1* csíranövények jellegzetes törpe fenotípusúak voltak. Etiolált állapotban szikleveleik szétnyíltak és hipokotiljük hossza a vad típusénak kevesebb, mint 10%-a volt, LD ciklusokban nevelve pedig rövid hipokotilt és epinasztikus szikleveleket fejlesztettek (50. ábra D, H).

Egyhónapos korban a *cyp90c1* növények rövid levélnyeleik miatt a vad típusénál tömöttebb levélrózsát növesztettek, virágzati tengelyük pedig rövidebb és vaskosabb volt, nagyobb járulékos levelekkel (51. ábra A, B). Az ugyanilyen idős *cyp90d1* növények csökkent apikális dominanciát mutattak, megrövidült elsődleges, és hosszú másodlagos virágzati tengelyekkel (51. ábra C). Ezen viszonylag enyhe fenotipikus jegyekkel szemben a *cyp90c1cyp90d1* kettős mutáns gömbszerű megjelenésű extrém törpe volt, megvastagodott levelekkel és alig előbújó virágzattal (51. ábra D, E).



50. ábra: CYP90C1- és CYP90D1-deficiens csíranövények fenotípusa MS táptalajon DD (A-D) és LD (E-H) viszonyok mellett nevelt egyhetes Col-0 (A, E), *cyp90c1* (B, F), *cyp90d1* (C, G) és *cyp90c1cyp90d1* (D, H) csíranövények. A lépték 5 mm-t jelöl.

A virágok morfológiájában a vad típus és a *cyp90d1* nem különbözött egymástól (51. ábra F, H). Ezekhez viszonyítva a *cyp90c1* virágok csésze- és

sziromlevelei, valamint porzói rövidebbek voltak, és közülük a normálisan fejlett termő jobban kiemelkedett (51. ábra G). A *cyp90c1cyp90d1* mutáns virágai kisebbek voltak, és nagyjából egy hét késéssel alakultak ki. Csészeleveleik teljesen eltakarták a csökevényes szirmokat, portokjaik pedig az igen rövid porzószálak miatt csaknem ülő helyzetűek voltak (51. ábra I). A dupla mutáns virágok hímsterilek voltak, mert portokjaik megfelelő méretük ellenére sohasem nyíltak fel.



51. ábra: Kifejlett CYP90C1- és CYP90D1-deficiens növények fenotípusa Egyhónapos, üvegházi körülmények közt nőtt Col-0 (A), *cyp90c1* (B), *cyp90d1* (C) és *cyp90c1cyp90d1* (D, E) növények, valamint Col-0 (F), *cyp90c1* (G), *cyp90d1* (H) és *cyp90c1cyp90d1* (I) virágok. A léptékek 30 (A-E), ill. 5 (F-I) mm-nek felelnek meg.

#### 4.3.2. Heterológ rendszerben kifejeztetett CYP90C1 és CYP90D1 vizsgálata

#### 4.3.2.1. Expresszáltatás rovar sejtekben

A CYP90C1 és CYP90D1 biokémiai vizsgálata céljából ezek cDNS-eit bakulovírus expressziós rendszer segítségével rovar sejtkultúrákban fejeztettük ki. A módszer hatékonyságát a fertőzött sejtekből izolált mikroszóma frakciók SDSpoliakrilamid gélelektroforézises analízisével ellenőriztük (52. ábra A). A sejtkultúrák a CYP90C1 esetében 80 nmol, a CYP90D1-nél 113 nmol P450 proteint termeltek literenként. A CYP90C1 és CYP90D1 tartalmú szolubilizált mikroszóma minták jellegzetes, P450-specifikus redukált CO differencia spektrumot mutattak, markáns 450 nm-es abszorpciós maximummal (ún. Soret-csúcs; 52. ábra B, C), ami az üres vektorral fertőzött preparátumban nem volt kimutatható. Mindez azt mutatta, hogy a bakulovírus-fertőzőtt rovarsejtek által termelt CYP90C1 és CYP90D1 aktív P450 monooxigenázok.



52. ábra: Funkcionális CYP90C1 és CYP90D1 heterológ kifejeztetése rovar sejtkultúrában

A: CYP90C1 és CYP90D1 enzimeket kifejező, ill. üres bakulovírussal (kontroll) fertőzött rovarsejtek mikroszómális frakcióinak proteinjei. A Coomassie Brilliant Blueval festett SDS géleletroforetogramok mellett méretmarkerek pozíciói vannak feltüntetve. B és C: Bakulovírus rendszerben kifejeztetett CYP90C1 (B) és CYP90D1 (C) Na-koláttal szolubilizált mikroszóma frakciókból mért redukált CO differencia spektruma.

#### 4.3.2.2. A CYP90C1 és CYP90D1 enzimek katalitikus aktivitása

A CYP90C1 és CYP90D1 katalitikus szerepének tisztázására in vitro konverziós teszteket végeztünk velük valamennyi késői C-6 oxidációs intermedierrel, a P450 regenerálódásához szükséges tisztított Arabidopsis NADPH-P450 reduktáz (Mizutani és Ohta, 1998) jelenlétében. A 30°C-on két óráig folytatott reakció termékeit oldószeres extrahálást, majd trimetilszilil derivatizálást követően GC-MS segítségével analizáltuk. A CYP90C1-gyel végzett reakciókban a vizsgált intermedierek közül a 6dezoxokataszteron 6-dezoxoteaszteronná történt átalakítását lehetett megfigyelni. Hasonló reakcióban a kataszteron teaszteronná való konverziója is észlelhető volt (53. ábra). A többi tesztelt szubsztrát esetében semmilyen konverziós termék nem volt kimutatható. Bár korábban a CYP90C1-deficiens rot3 mutáns BR tartalmának analízise alapján Kim GT és mtsai (2005) ennek az enzimnek C-2 hidroxiláz aktivitás tulajdonítottak, kísérleti rendszerünkben а 6-dezoxotifaszterol 6dezoxokasztaszteronná alakulását nem tudtuk detektálni. Eredményeink azt mutatták, hogy a CYP90C1 a 6-dezoxokataszteron  $\rightarrow$  6-dezoxoteaszteron, ill. kataszteron  $\rightarrow$ dezoxoteaszteron C-23 hidroxilációs lépést katalizálja. A tisztított CYP90D1-gyel



53. ábra: Heterológ expresszált CYP90C1 és CYP90D1 termékeinek GC-MS azonosítása

A CYP90C1, ill. CYP90D1 enzimek által 6-dezoxokataszteronból, valamint kataszteronból létrehozott reakciótermékek szelektált ion kromatogramjai.

ugyanezen vizsgálatokat elvégezve hasonló eredményt kaptunk (53. ábra). Ez azt mutatta, hogy a CYP90C1 és CYP90D1 ugyanazért a C-23 hidoxilációs reakcióért felelős.

# 4.3.2.3. Enzimkinetikai jellemzők

A korábban CYP90B1-gyel végzett enzimkinetikai adatok (Fujita és mtsai, 2006) a BR bioszintézis korai C-22 hidroxilációs útjának (3. ábra) elsődleges szerepére

szubsztrát	termék	retenciós idő (min)	jellemző ionok <i>m</i> /z (rel. intenzitás, %)
CYP90C1			
22-OHCR	22,23-diOHCR	10,34	529 (0,6); 438 (4,1); 423 (8,1); 129 (100)
	szintetikus	10,37	529 (0.3); 438 (3.3); 243 (7.8); 129 (100)
22-OH-4-en-3-on	22,23-diOH-4-en-3-on	11,55	454 (2.1); 281 (3.1); 229 (25.9); 124 (100)
	szintetikus	11,53	454 (1.0); 281 (1.2); 229 (25.8); 124 (100)
22-OH-3-on	6dDT	10,72	456 (3,4); 283 (7,7); 231 (100); 155 (52,5)
	szintetikus	10,70	456 (1,4); 283 (3,7); 231 (100); 155 (52,3)
3-epi-6dCT	6dTY	9,68	530 (0,3); 440 (8,0); 425 (18,8); 215 (100)
	szintetikus	9,68	530 (0,2); 440 (6,7); 425 (17,2); 215 (100)
6dCT	6dTE	10,46	530 (0,8); 516 (4,8); 425 (7,4); 215 (100)
	szintetikus	10,46	530 (0,1); 516 (4,5); 425 (8,5); 215 (100)
CYP90D1			
22-OHCR	22,23-diOHCR	10,35	529 (0,1); 438 (4,1); 243 (7,3); 129 (100)
	szintetikus	10,37	529 (0,3); 438 (3,3); 243 (7,8); 129 (100)
22-OH-4-en-3-on	22,23-diOH-4-en-3-on	11,51	454 (2,1); 281 (3,3); 229 (25,9); 124 (100)
	szintetikus	11,53	454 (1,0); 281 (1,2); 229 (25,8); 124 (100)
22-OH-3-on	6dDT	10,70	456 (1,7); 283 (6,3); 231 (100); 155 (54,5)
	szintetikus	10,70	456 (1,4); 283 (3,7); 231 (100); 155 (52,3)
3-epi-6dCT	6dTY	9,68	530 (0,1); 440 (7,3); 425 (18,6); 215 (100)
	szintetikus	9,68	530 (0,2); 440 (6,7); 425 (17,2); 215 (100)
6dCT	6dTE	10,46	530 (0,8); 516 (4,6); 425 (7,1); 215 (100)
	szintetikus	10,46	530 (0,1); 516 (4,5); 425 (8,5); 215 (100)

# 10. táblázat: A CYP90C1 és CYP90D1 termékek GC-MS adatai

utaltak. Mivel ennek indermedierei a C-23 hidroxiláció lehetséges szubsztrátjai, megvizsgáltuk 22-hidroxikampeszterol, 22-OH-4-en-3-on, 22-hidroxiergoszt-3-on (22-OH-3-on), 6-dezoxokataszteron és 3-epi-6-dezoxokataszteron CYP90C1, ill. CYP90D1 általi metabolizálhatóságát is. Ezekből a reakciókból kitűnt, hogy mindkét enzim képes volt valamennyi C-22-hidroxilált szubsztrát átalakítására a megfelelő 23-hidroxilált termékekké (10. táblázat). Az alkalmazott 20 µM szubsztrát-koncentrációnál a CYP90C1 aktivitása 3-epi-6-dezoxokataszteron > 22-OH-3-on, 22-OH-4-en-3-on > 22-hidroxikampeszterol, 6-dezoxokataszteron sorrend szerint, míg a CYP90D1 enzimé nagyjából hasonló módon, 3-epi-6-dezoxokataszteron, 22-OH-3-on, 22-OH-4-en-3-on >> 22-hidroxikampeszterol, 6-dezoxokataszteron sorrendben, nagymértékben változott. Ezek az eredmények a két enzimnek a C-22-hidroxilált BR származékokkal szembeni széles szubsztrát-specificitását és differenciált affinitását mutatták.

enzim	szubsztrát	K <sub>m</sub> (µM)	k <sub>cat</sub> (min⁻¹)	k <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )
CYP90C1	22-OHCR	19,4 ± 1,18	0,11 ± 0,01	0,0057 ± 0,0003
	22-OH-4-en-3-on	4,94 ± 0,02	1,40 ± 0,05	$0,29 \pm 0,02$
	22-OH-3-on	8,61 ± 0,34	2,75 ± 0,04	0,32 ± 0,01
	3-epi-6dCT	6,61 ± 0,38	3,01 ± 0,22	0,45 ± 0,018
	6dCT	35,9 ± 1,35	0,14 ± 0,004	0,0038 ± 0,0002
CYP90D1	22-OHCR	18,1 ± 1,01	0,12 ± 0,01	0,0068 ± 0,0008
	22-OH-4-en-3-on	0,77 ± 0,03	1,01 ± 0,07	1,32 ± 0,09
	22-OH-3-on	0,73 ± 0,04	1,27 ± 0,05	1,73 ± 0,14
	3-epi-6dCT	1,06 ± 0,03	1,10 ± 0,04	1,04 ± 0,006
	6dCT	16,9 ± 1,12	$0,29 \pm 0,01$	0,017 ± 0,001

11. táblázat: A CYP90C1 és CYP90D1 reakciók kinetikai paraméterei

Az intermedierek neveinek rövidítései azonosak az 54. ábrán szereplőkkel.

A CYP90C1 és CYP90D1 specificitásának pontosabb megismerése céljából meghatároztuk a két enzim kinetikai paramétereit 22-hidroxilált BR szubsztrátok jelenlétében. A tesztelt intermedierek esetében a CYP90C1 6-dezoxokataszteronnal mutatott legnagyobb disszociációs állandót ( $K_m$ ) és legalacsonyabb katalitikus hatásfokot (specificitási állandó;  $k_{cat}/K_m$ ). A 3-epi-6-dezoxokataszteron esetében a mért

 $K_m$  5,3-szer volt alacsonyabb, a katalitikus állandó ( $k_{cat}$ ) pedig 22,6-szor magasabb a 6dezoxokataszteron ugyanezen értékeinél, ami 120-szor nagyobb katalitikus hatásfokot eredményezett. A 22-OH-3-on és 22-OH-4-en-3-on kinetikai jellemzői a 3-epi-6dezoxokataszteronéval összevethetők voltak, míg a 22-hidroxikampeszterol a 6dezoxokataszteronhoz hasonló rossz szubsztrátnak bizonyult (11. táblázat).

A CYP90D1 szubsztrát-specificitása a CYP90C1-ére emlékeztetett. A 22-OH-3on, 22-OH-4-en-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron mellett mért hasonló Km és kcat értékek 60-100-szor nagyobb katalitikus hatásfokot biztosítottak, mint 6dezoxokataszteron, vagy а leggyengébb szubsztrátnak számító 22hidroxikampeszterol esetében. A két enzimet összehasonlítva, a CYP90D1 22-OH-3on, 22-OH-4-en-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron jelenlétében meghatározott  $K_{\rm m}$ konstansai 6-11-szer, k<sub>cat</sub> állandói pedig 1,4-3-szor voltak alacsonyabbak a CYP90C1 megfelelő értékeinél (11. táblázat).

A CYP90C1 és CYP90D1 számára in vitro egyaránt a 22-OH-3-on, 22-OH-4en-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron volt preferált szubsztrát, míg a 22és 6-dezoxokataszteron átalakítását hidroxikampeszterol rossz hatásfokkal katalizálták. Adataink azt valószínűsítették, hogy a két enzim specificitása in vivo körülmények közt is hasonló lehet. Figyelemreméltó, hogy а 3-epi-6dezoxokataszteron, ill. 22-OH-3-on C-23 hidroxilációjával 6-dezoxotifaszterol és 3dehidro-6-dezoxoteaszteron keletkezik, amelyek az általánosan elfogadott BR bioszintézis séma (Fujioka és Yokota, 2003; 3. ábra) szerint a 6-dezoxoteaszteront követően jönnek létre. Emellett а 22-hidroxikampeszterol  $\rightarrow$ 22.23dihidroxikampeszterol és 22-OH-4-en-3-on → 22,23-dihidroxiergoszt-4-en-3-on (22,23diOH-4-en-3-on) reakciók során a bioszintézis korábban nem azonosított intermedierei képződnek.

#### 4.3.3. A CYP90C1 és CYP90D1 hiányának hatása a BR tartalomra

A C-23 hidroxilázok hiányának a BR szintézisre gyakorolt hatását felderítendő GC-MS analízissel meghatároztuk az endogén BR tartalmat egyhónapos *cyp90c1cyp90d1* növényekben (12. táblázat). Eredményeink szerint a korai C-6 oxidációs út kezdeti intermediereinek számító kataszteron és teaszteron mennyiségei hasonlóak voltak a vad típusú kontrolléhoz. Az ezeket követően keletkező köztes termékek szintjében fokozatos csökkenés volt tapasztalható, nevezetesen a 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron mennyisége mintegy 20, míg a 6-dezoxotifaszterolé mintegy 5 százaléka volt a Col-0 növényekének. A 6-dezoxokasztaszteron, kasztaszteron, valamint a korai C-6 oxidációs termékek közül a teaszteron, 3-dehidroteaszteron és tifaszterol a detektálási szint körül, vagy az alatt volt jelen, míg BL és kataszteron sem a vad típusban, sem a mutáns vonalban nem volt észlelhető.

Biokémiai eredményeink szerint a korai C-22 hidroxilációs út intermedierei a 23hidroxilációs reakciók preferált szubsztrátjai, ezért meghatároztuk ezek mennyiségeit is. A legideálisabb szubsztrátoknak számító 22-OH-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron nagyjából a 6-dezoxokataszteronnal megegyező abundanciát mutatott, a 22hidroxikampeszterol szintje pedig ezekénél alacsonyabb volt. A GC-MS analízissel 22,23-dihidroxikampeszterol és 22,23-diOH-4-en-3-on nem volt kimutatható sem a mutáns, sem a vad típusú növényekben (12. táblázat).

	en	endogén hormonszint (ng kg <sup>-1</sup> friss tömeg)			
BR	Col-0	cyp90c1cyp90d1	Col-0	cyp90c1cyp90d1	
	első	első analízis		második analízis	
	(27,1 g)	(54,4 g)	(20,0 g)	(44,2 g)	
BL	ND	ND	ND	ND	
CS	177	ND	141	ND	
6dCS	394	ND	1318	ND	
6dTY	911	45	988	ND	
6dDT	266	62	255	25	
6dTE	154	186	40	20	
3-epi-6dCT	913	625	697	427	
6dCT	1502	1057	772	456	
TY	ND	ND	nyom	ND	
DT	ND	ND	47	10	
TE	ND	ND	3,5	nyom	
СТ	ND	ND	ND	ND	
22,23-diOH-4-en-3-on	ND	ND	ND	ND	
22,23-diOHCR	ND	ND	ND	ND	
22-OH-4-en-3-on	ND	ND	ND	ND	
22-OH-3-on	412	380	950	448	
22-OHCR	326	305	180	215	

12. táblázat: Col-0 és cyp90c1cyp90d1 növények endogén BR tartalma

Az intermedierek neveinek rövidítései azonosak az 54. ábráéval. ND: nem detektált.

A *cyp90c1cyp90d1* növények 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron- és 6dezoxotifaszterol-deficienciája alapján várható volt, hogy az ezek kialakulásához szükséges 23-hidroxilációs szubsztrátok a reakció hiányában felszaporodnak. Ennek ellenére a kettős mutánsban nem észleltük a 22-OH-3-on, 3-epi-6-dezoxokataszteron, vagy 6-dezoxokataszteron felhalmozódását, sőt ezen BR formák mennyisége a vad típusú kontrollénál rendre valamivel alacsonyabb volt (12. táblázat).

### 4.3.4. A cyp90c1cyp90d1 kettős mutáns menekítése BR intermedierekkel

A cyp90c1cyp90d1 mutáns BR-deficienciájának vizsgálatára egyhetes etiolált csíranövényeken fenotípus menekítési teszteket végeztünk a korai és késői C-6 oxidációs szintézisutak interermediereivel. Az alkalmazott 100 nm koncentrációnál a BL, kasztaszteron, 6-dezoxokasztaszteron, tifaszterol, 6-dezoxotifaszterol, teaszteron és 6-dezoxoteaszteron mintegy kétszeres hipokotil-megnyúlást idézett elő, míg a kataszteronnak és 6-dezoxokataszteronnak nem volt érdemi hatása (54. ábra A). Tekintettel a BR-ok levélmegnyúlásban játszott szerepére, megvizsgáltuk ugyanezen intermedierek hatását a LD fényviszonyok mellett nőtt csíranövények levélnyelének megnyúlására is. A cyp90c1cyp90d1 mutáns esetében 48 órás, 100 nm-os BL kezelés mintegy ötszörös levélnyél növekedést eredményezett. Ugyanebben а koncentrációban a kataszteron és 6-dezoxokataszteron hatástalan volt a levélnyél tesztben, a többi BR intermedier viszont legalább háromszoros megnyúlást okozott (54. ábra B). A kontrollként használt, kezdeti C-5 redukcióban sérült det2 növények minden használt intermedierrel menekíthetők voltak mindkét típusú kísérletben (54. ábra A, B).

Ugyanezekkel a menekítési tesztekkel megvizsgáltuk számos C-22-hidroxilált intermedier és 23-hidroxilált származékaik menekítő hatását is *cyp90c1cyp90d1* és kontroll *det2* csíranövényeken (54. ábra C, D). Ennek során a 22-hidroxikampeszterol, 22-OH-4-en-3-on, 22-OH-3-on, 6-dezoxokataszteron és 3-epi-6-dezoxokataszteron kezelés nem eredményezett érdemi hipokotil-, vagy levélnyél-megnyúlást. Ezzel szemben a 22,23-dihidroxilált intermediereknek mindkét tesztben erős menekítő hatása volt. A várakozásnak megfelelően a *det2* mutáns a telítetlen A és B gyűrűvel rendelkező 22-hidroxikampeszterol és 22-OH-4-en-3-on kivételével valamennyi intermedierre nagyfokú elongációs választ adott. A menekítési kísérletek adatai a C-23 hidroxiláció hiányát jelezték a *cyp90c1cyp90d1* mutánsban, megerősítve a CYP90C1 és CYP90D1 enzimek biokémiai vizsgálatokkal kimutatott C-23 hidroxiláz funkcióját.

Emellett a kapott eredmények - a biokémiai adatokkal összhangban - valószínűsítették a BR szintézisben a 22,23-dihidroxikampeszterolon és 22,23-diOH-4-en-3-onon keresztüli szintézisutak *in vivo* szerepét.



54. ábra: A cyp90c1cyp90d1 kettős mutáns fenotípusának menekítése BR-okkal Etiolált csíranövények hipokotiljának (A, C), ill. fényben nőtt csíranövények levélnyelének (B, D) megnyúlása a korai és késői C-6 oxidációs utak (A, B), valamint a korai C-22 hidroxilációs út (C, D) intermediereinek hatására. A hipokotil mérésnél MS médiumon DD körülmények közt nőtt egyhetes növényeket zöld biztonsági fény mellett helyeztünk át további egy hétre hormontartalmú táptalajra, változatlan DD viszonyok mellett. A levélnyél mérésnél MS médiumon LD nevelt egyhetes növényeket két napig kezeltünk levegőztetett folyadék táptalajban, azonos fényviszonyok mellett. A kezelésekhez hormonmentes (ktr), vagy 100 nm 6-dezoxokataszteront (6dCT), kataszteront (CT), 6-dezoxoteaszteront (6dTE), teaszteront (TE), 6-dezoxotifaszterolt (6dTY), tifaszterolt (TY), 6-dezoxokasztaszteront (6dCS), kasztaszteront (CS), brasszinolidot (BL), 22-hidroxikampeszterolt (22-OHCR), 22-hidroxiergoszt-4-en-3-ont (22-OH-4-en-3-on), 22-hidroxiergoszt-3-ont (22-OH-3-on), 3-epi-6-dezoxokataszteront (3-epi-6dCT), 22,23-dihidroxikampeszterolt (22,23-diOHCR), 22,23-dihidroxiergoszt-4-(22,23-diOH-4-en-3-on), 3-dehidro-6-dezoxoteaszteront en-3-ont vagy (6dDT) tartalmazó táptalajt használtunk. Az adatok 50-50 csíranövény alapján számolt átlagok a szórási értékekkel.

### 4.3.5. A CYP90C1 és CYP90D1 szerepe a BR szintézisben

Biokémiai cyp90c1cyp90d1 mutáns C-23-hidroxilált adataink és а intermedierekkel való menekíthetősége alapján kimutatható volt, hogy a CYP90C1 és CYP90D1 alapvetően azonos funkciójú BR 23-hidroxilázok. Korábban szintén menekítési teszt alapján a CYP90A1/CPD enzimnek lehetett C-23 hidroxiláz funkciót tulajdonítani (saját adataink). In vivo a működőképes CYP90A1 valamilyen módon szükséges a 23-hidroxilált BR formák létrejöttéhez, ezt a cpd mutáns ezen intermedierekkel való menekíthetősége mellett a cyp90c1cyp90d1-gyel gyakorlatilag megegyező BR intermedier tartalma is alátámasztja (saját publikálatlan adataink). Ugyanakkor a cpd funkcionális CYP90C1 és CYP90D1 génjei ellenére is extrém törpe fenotípusú, a heterológ rendszerben kifejeztetett CYP90A1 pedig in vitro nem mutat 23-hidroxiláz aktivitást (Ohnishi és mtsai, 2007), így a CYP90C1 és CYP90D1 szerepe a CYP90A1-ével bizonyosan nem redundáns. Említésre érdemes, hogy mind a cyp90c1cyp90d1, mind a cpd növények jól detektálható mennyiségben tartalmaznak 23-hidroxilált BR formákat (12. táblázat), ami az Arabidopsisban további reziduális, esetleg nem is P450 eredetű 23-hidroxiláz aktivitásra utal.

Vizsgálatainkat megelőzően a CYP90C1 és CYP90D1 géneket érintő egyszeres és dupla mutációk fenotipikus hatásai által sugallt azonos funkció ellenére a CYP90C1- és CYP90D1-hez különböző katalitikus szerepet rendeltek (Kim GT és mtsai, 2005). A rot3-1 és egy cyp90d1 vonal BR tartalmának GC-MS analízise alapján CYP90C1-et tifaszterol/6-dezoxotifaszterol а а  $\rightarrow$ kasztaszteron/6dezoxokasztaszteron átalakulást mediáló C-2 hidroxiláznak gondolták, a CYP90D1 szerepét pedig egy ennél korábbi, nem pontosan definiált konverziós lépésnél képzelték el. Ezek a szerzők ugyanakkor maguk is felhívták a figyelmet adataik értelmezési problémáira, amik főleg abból adódtak, hogy az egyszeres mutációk mind a BR tartalmat, mind a fenotípust csak igen csekély mértékben befolyásolták (Kim GT és mtsai, 2005). Munkájuk egyik nyilvánvaló ellentmondása volt, hogy cyp90c1cyp90d1 kettős mutánsuk (a mi adatainkkal egyezően) teaszteronnal, 6-dezoxoteszteronnal, valamint az ezeket követően létrejövő BR-ok mindegyikével menekíthető volt, holott ez a C-2 hidroxiláz funkció hiányában csak a 6-dezoxokasztaszteron, kasztaszteron és BL hatására lett volna várható (3. ábra).

A rizs d2 törpemutáns jellemzése során Hong és mtsai (2003) által azonosított CYP90D2 az Arabidopsis CYP90C1-gyel 46%, a CYP90D1-gyel 54% aminosav-

szekvencia egyezést mutatott. Az endogén BR tartalom alapján a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ez az enzim C-3 oxidázként a teaszteron/6dezoxoteaszteron  $\rightarrow$  3-dehidroteaszteron/3-dehidro-6-dezoxoteaszteron reakciót katalizálja. A kísérleti adatok interpretálása itt sem lehetett egyértelmű, egyrészt a gyenge fenotipikus hatás miatt, másrészt mert a rizs egy, a *CYP90D2*-vel nagymértékben homológ *CYP90D3* génnel is rendelkezik (Hong és mtsai, 2003). A rizs feltehetően redundáns funkciójú CYP90D enziméről a *d*2 és az *Arabidopsis cyp90d1* mutánsok igen hasonló BR összetétele alapján elképzelhető, hogy valójában ezek is C-23 hidroxilázok.

Nem világos, hogy az *Arabidopsis* számára két hasonló jellegű C-23 hidroxiláz jelenléte milyen előnyt jelenthet. A Genevestigator (www.genevestigator.etzh.ch) adatbázisban szereplő normalizált "microarray" hibridizációs adatok szerint a *CYP90C1* a legtöbb szervben és fejlődési stádiumban a *CYP90D1*-nél kettő-ötször erősebben fejeződik ki. Az adatok a kifejlett növényben a legerősebb *CYP90C1* expressziót a fejlődő szirmokban, míg legintenzívebb, a *CYP90C1*-ét is meghaladó *CYP90D1* mRNS-szintet a virágzati tengelyben jelezték. Ezek az eredmények jó egyezést mutattak azzal, hogy a *cyp90c1* mutánsnál a sziromlevelek, a *cyp90d1* vonalnál pedig a virágzati tengely megrövidülése volt megfigyelhető.

### 4.3.6. A BR bioszintézis C-23-hiroxilációs söntjei

Enzimkinetikai vizsgálataink azt mutatták, hogy a CYP90C1 és CYP90D1 számára a korai C-22 hidroxilációs úthoz (Fujioka és mtsai, 2002; 3. ábra) tatozó 22-OH-4-en-3-on, 22-OH-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron számítanak preferált szubsztrátnak. A BR szintézis C-22 hidroxilációs reakcióinak jelentőségét *Arabidopsis*ban izotóppal jelölt intermedierekkel, valamint a 22-hidroxikampeszterol, 22-OH-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron kimutatásával (Fujioka és mtsai, 2002; saját adataink) *in vivo* is alá lehetett támasztani. Emellett biokémiai mérések alapján a kampeszterol bizonyult a CYP90B1 C-22 hidroxiláz elsődleges szubsztrátjának (Fujita és mtsai, 2006), ami azt jelzi, hogy a BR bioszintézis első lépése elsődlegesen a korai C-22 hidroxilációs út felé történik.

A CYP90C1 és CYP90D1 szubsztrát-preferenciájára vonatkozó eredményeink alapján valószínűsíthető volt egy olyan bioszintetikus út, amelyben a korai C-22hidroxilált intermedierek a C-23 hidroxiláció kitüntetett szubsztrátjai (55. ábra). A késői C-6 oxidációs ágon a 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron és 6-dezoxotifaszterol kialakulása kampeszterolból hat, ill. hét konverziós lépést igényel a kampeszterol  $\rightarrow$  ergoszt-4-en-3-on  $\rightarrow$  ergoszt-3-on  $\rightarrow$  kampesztanol  $\rightarrow$  6-dezoxokataszteron  $\rightarrow$  6-dezoxoteaszteron 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron  $\rightarrow$  6-dezoxotifaszterol reakciósor mentén (3. ábra). A 22-OH-3-on és 3-epi-6-dezoxokataszteron 23-hidroxilációja révén a 3-dehidro-6dezoxoteaszteron és 6-dezoxotifaszterol szintézise mindössze négy, ill. öt lépésben megtörténhet. Az érintett intermedierek kémiai szerkezete alapján egy ilyen közvetlen szintézisút lehetősége már korábban is felvetődött (Fujioka és mtsai, 2002). A kampeszteroltól BL-ig vezető rövidebb szintézis során a szükséges enzimatikus



55. ábra: A BL szintézis sémája a rövidített C-23 hidroxilációs utakkal

A CYP90C1 és CYP90D1 által katalizált átalakulásokat vastag, ezeken belül a C-23 hidroxilációs sönt lépéseit vastag piros nyilak jelzik. A színes háttér a BR szintézis elsődleges útvonalait emeli ki. Az intermedierek rövidített elnevezései megegyeznek az 3. és 54. ábrán használtakkal.

reakciók száma a C-3 redukciós (ergoszt-3-on  $\rightarrow$  kampesztanol) és az azt követő C-3 oxidációs (6-dezoxoteaszteron  $\rightarrow$  3-dehidro-6-dezoxoteaszteron) lépések kikerülésével csökkenhet (55. ábra). Ennek alapján javasoltuk a rövidített szintézisút megjelölésére a C-23 hidroxilációs sönt elnevezést.

A C-23 hidroxilációs sönt funkcionális jelentőségére utal, hogy míg a cyp90c1cyp90d1 mutánsban a 22,23-dihidroxilált 3-dehidro-6-dezoxoteaszteron és 6mennyisége nagymértékben lecsökken, dezoxotifaszterol а prekurzor 6dezoxoteaszteron viszonylag abundáns marad (Kim GT és mtsai, 2005; saját adataink). Ez azt jelzi, hogy a 6-dezoxoteaszteron nem vesz részt hatékonyan a bioaktív BR-ok szintézisében. A 6-oxokampesztanolon át haladó BR szintézis alárendelt szerepére további in vivo bizonyítékot szolgáltattak Kwon és mtsai (2005), akik az találták, hogy a késői C-6 oxidáció enzimeiben deficiens cyp85a1cyp85a2 kettős mutánsban a 6-oxokampesztanol felhalmozódik, és nem alakul tovább a kasztaszteron és BL szintézis irányába. Eredményüket megerősíti az is, hogy a CYP90B1 in vitro enzimológiai vizsgálata során a kampeszterolhoz viszonyítva a 6oxokampesztanol és kampesztanol is igen rossz szubsztrátnak bizonyult (Fujita és mtsai, 2006).

Feltételezve, hogy a BR-ok jórészt a C-23 hidroxilációs söntön keresztül szintetizálódnak, nem volt világos a kevésbé preferáltnak tűnő reakcióutakba eső, viszonylag nagy mennyiségben jelenlevő 6-dezoxokataszteron és 6-dezoxoteaszteron szerepe. Újabban a borsó szemfejlődését és csírázását kísérő BR anyagcsere változások vizsgálata feltárta, hogy a száraz borsószemek nagy mennyiségű 6-dezoxokataszteront raktároznak, amely csírázáskor bioaktív kasztaszteronná alakul (Nomura és mtsai, 2007). Ennek alapján feltételezhető, hogy a 6-dezoxokataszteron és 6-dezoxoteaszteron ás szeren *Arabidopsis*ban is elsősorban biológiailag inaktív BR tartalékul szolgál, amely C-23 hidroxiláció révén könnyen visszatáplálható a fő szintézisútba.

A CYP90C1 és CYP90D1 egyik kitüntetett szubsztrátjául szolgáló 22-OH-4-en-3-on, és az annak 23-hidroxilációjával keletkező 22,23-diOH-4-en-3-on jelenlétét vad típusú *Arabidopsis*ban GC-MS analízissel nem lehetett kimutatni (Fujioka és mtsai, 2002; saját adataink). Ugyanakkor 22-OH-4-en-3-on detektálható volt a det2 mutánsban és *Catharanthus* mintákban is (Fujioka és mtsai, 2002), a 22,23-diOH-4-en-3-on pedig menekítette a *cyp90c1cyp90d1* mutáns törpe fenotípusát. Ezen intermedierek alacsony szintjét annak lehetett tulajdonítani, hogy hatékonyan konvertálódnak az aktív BR formák irányában. Ezt később megerősítette, hogy a *det2cpd* kettős mutánsban GC-MS analízissel valamennyi prediktált 22-hidroxilált, ill. 22,23-dihidroxilált intermedier észlelhető volt (saját publikálatlan adatunk).

Furcsa módon a *cyp90c1cyp90d1* mutánsban a C-23 hidroxiláció hiánya nem eredményezte a lehetséges CYP90C1 és CYP90D1 szubsztrátok felhalmozódását. Bár a BR-deficiencia a végtermék-visszacsatolás folytán a bioszintetikus gének fokozott expresszióját idézi elő, ebben a mutánsban az összes BR tartalom a vad típusénak csak mintegy 30-50%-a volt. Ennek egyik oka lehet, hogy a C-23 hidroxilázok hiánya a BR szintézis általános gátlásához vezet. Amennyiben az endoplazmatikus retikulum membránjában lokalizálódó CYP85 és CYP90 enzimek multienzim-komplexként (ún. metabolon) működnek (Winkel, 2004; Jorgensen és mtsai, 2005), a CYP90C1 és/vagy CYP90D1 hiánya megzavarhatja ennek összeszerelődését. Elképzelhető az is, hogy a fel nem használódó BR intermedierek valamilyen mechanizmus révén más irányban metabolizálódnak. Rouleau és mtsai (1999) repcében azonosítottak egy indukálható szteroid-szulfotranszferázt (BNST3), amely elsősorban korai BR intermediereket szulfonál azok C-22 hidroxil csoportján.

#### 4.4. Egy BR-regulált RING-H2 gén karakterizálása

[A részfejezet alapjául szolgáló publikáció: 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]

A BR-ok szerepét számos alapvető élettani funkció szabályozásában ki lehetett mutatni. Munkánk idején ismert volt a BR-ok receptoraként a plazmamembránban működő BRI1 LRRK protein (Li JM és Chory, 1997), de a jelátvitelben résztvevő molekulák - csakúgy, mint a célgének többsége - ismeretlenek voltak. Ezért BR szignálúthoz kapcsolódó folyamatok vizsgálata céljából olyan ún. elsődleges transzkripciós válaszokat kívántunk azonosítani, amelyek hormonkezeléssel gyorsan és közvetlenül, *de novo* proteinszintézis nélkül is kiválthatók. Az ilyen módon regulált gének gyakran olyan proteineket kódolnak, amelyek a hormon hatását közvetítő további gének működését kontrollálják. A korai auxin-indukálható gének termékeinek egy részéről például kimutatták, hogy azok az auxin hatását közvetítő transzkripciós szabályozók szintézisét és stabilitását befolyásolják (Abel és Theologis, 1996; Gray és Estelle, 2000). Munkánkhoz eszközül a BR-kezelt és kezeletlen növényekben kialakuló génspecifikus cDNS-szint különbségek kimutatására alkalmas ún. "differential display" RT-PCR módszert (DD RT-PCR) választottuk. Vizsgálatunk célja olyan mRNS-ek azonosítása volt, amelyek mennyisége BR kezelés hatására gyorsan és jelentős mértékben változik. Az ilyen, ún. korai hormonválaszként szabályozott transzkriptumok közül azokat terveztünk kiválasztani funkcionális jellemzés céljára, amelyeknél a kódolt protein jellege eleve valamilyen regultaív szabályozásban betöltött szerepre utal. A tervezett karakterizálás során meg kívántuk határozni az azonosított gének expressziós tulajdonságait, és hogy kifejeződési szintjük manipulálása eredményez-e olyan élettani, vagy morfológiai elváltozást, amely ismert szignálátviteli utakkal való kapcsolatukra utalhat.

### 4.4.1. A BRH1 cDNS izolálása és jellemzése

Az újabb, nagy hatékonyságú transzkripciós analízisek eredményeiből ismert, hogy hormonkezelésre a BR-szabályozott gének túlnyomó többsége legfeljebb kétszeres expressziós változást mutat (Vert és mtsai, 2005). Ennek megfelelően DD RT-PCR szűrésünk eredményeként mindössze három BR-reszponzív mRNS-t tudtunk azonosítani. A BR hatástól függően eltérő mértékben felhalmozódó transzkriptumok közül egy olyat választottunk ki alaposabb jellemzésre, amely egy ún. RING-finger típusú fehérjét kódol.

A RING (eredetileg a "really interesting new gene" elnevezésből) fehérjék olyan metalloproteinek, amelyek a törzsfejlődés során erősen konzervált, Cys és His aminosavakból álló ún. RING szekvencia-motívum révén két cink atom koordinálására képesek. Változatos, például a szignálátvitelben, vezikuláris transzportban, sejtosztódásban és az embrionális mintázat kialakításában felismert szerepük alapján feladatuk elsősorban többkomponensű regulatív protein komplexek specifikus összekapcsolása és stabilizálása (Saurin és mtsai, 1996; Borden, 2000). A RING motívumot, és különösen annak két His maradékot hordozó ún. RING-H2 variánsát tartalmazó proteinek közül többnek mutatták ki meghatározó szerepét az ubikvitináción keresztüli célzott fehérje degradációban (Joazeiro és Weissman, 2000). Az edényes növényekben meglepően formagazdag RING-finger fehérjékből az *Arabidopsis* genom leírása során 358-at azonosítottak, ami a prediktált 25498 proteinnek több mint 1,4%-a (The A*rabidopsis* Genome Initiative, 2000), ezek nagyfokú redundanciája miatt csak kevesük élettani funkciója volt ismert.

A DD RT-PCR segítségével azonosított, BR hatásra csökkenő szintű *BRH1* (*BRASSINOSTEROID-RESPONSIVE RING-H2 1*) transzkriptum jellemzését egy λgt10 vektorban klónozott 723 bp-os cDNS-ből (GenBank AF134155) kiindulva végeztük. Ez

20 bp 5', és 193 bp 3' nem transzlált szakaszokat, valamint ezek közt egy 170 aminosavnyi proteinnek megfelelő, 510 bp-os kódoló szekvenciát tartalmazott. A *BRH1* gén pozíciója - Col-0 genomi szekvenciák élesztő mesterséges kromoszómákban (YAC) létrehozott klónjainak a cDNS-sel történt hibridizációja alapján - az *Arabidopsi*s 3. kromoszómáján, a *FUS6* közelében volt lokalizálható. A térképezési és genomi Southern-hibridizációs eredmények szerint (nem bemutatott adat) a *BRH1* egyetlen kópiás génnek bizonyult. Ennek intront nem tartalmaz kódoló részének ATG startkodonjától 5' irányban 105 bp-ra található a feltételezett TATA transzkripciós szignál (TATAAAT), amelytől kiindulva a startkodon az első ATG triplet.

A kódoló szekvenciából származtatott aminosav-szekvencia alapján a BRH1 20,06 kDa molekulatömegű protein. Az N-terminális 87 aminosavas szakasza hidrofób maradékokban gazdag (66%), C-terminális régiójában pedig a jellegzetes C-x<sub>2</sub>-C-x<sub>15</sub>-C-x-H-x<sub>2</sub>-H-x<sub>2</sub>-C-x<sub>11</sub>-C-x<sub>2</sub>-C szerkezetű RING-H2 motívum (Saurin és mtsai, 1996) található. BLAST homológia analízissel a proteinben más funkcionális domén nem volt azonosítható. Az *Arabidopsis* többi RING-H2 fehérjéjével mutatott szekvencia homológiát alapul véve a BRH1 a Jensen és mtsai (1998) által definiált RH csoportjába, ezen belül annak RHA alcsoportjába tartozik (56. ábra A, B).

#### 4.4.2. A BRH1 gén hormonális szabályozása

A *BRH1* BR-szabályozottságát Northern-analízissel ellenőrizve azt találtuk, hogy nyolcnapos csíranövényekben transzkriptumának szintje az 1 µM BL-os kezelés kezdetétől számítva már egy órán belül a kezdetinek mintegy 30%-ára csökkent (57. ábra C). Ez a hatás a fehérjeszintézist gátló cikloheximid jelenlétében is megfigyelhető volt, jelezve, hogy kialakulásához elégségesek a sejtekben már meglevő regulatív proteinek. A BR-hiányos *cpd* mutánsnak a vad típusénál magasabb *BRH1* mRNS szintje BR kezeléssel szintén csökkenthető volt, bár ez a változás valamivel kisebb mértékű volt (57. ábra A). A BRI1 receptor hiánya miatt BR-inszenzitív *cbb2* vonalban viszont ugyanilyen kezelésre a transzkriptum szintje nem változott (57. ábra B), ami azt mutatta, hogy hormonválasz a BR szignálút közvetítésével alakul ki.

Tekintettel arra, hogy a fitohormonok összehangoltan, gyakran egymás jelátviteli reakcióit is befolyásolva hatnak, megvizsgáltuk az auxinok, citokininek, gibberellinek, abszcizinsav és etilén hatását is a *BRH1* transzkriptum szintjére. Ezen
Α

BRH1	MCG22XCYM-DWFLPKDGYONDSINCONNAPSINGANAMESIGRANCONNPDYTSYPURIPENRS	64
At1q63840	MCTPYCYS-PLLLPKIFFYLISFICLURKLISTMCKIICHPDTMPPPVS-TSWPDPPPTLTLPDS	64
At5q41400	MCYPYCYM-BLLLPRIBLHLISLICLURTLIDTGRIDGPD575SDPVSSSSSWLEPPYMSTAAHHHOESSFFF	74
RHA1a	MCLPEDFITPLOIPGYILKIPYVIGFRDMWDALCPTIGPSGTDHNENSGPDPWRHALSTS	62
RHA1b	MCLETDFK-BLOIPGYVLKTYVIGFRDMWDALCPYIGPRSTDHNERSRPDPWRLALSTS	61
RHA2a	MCLOGOLS-DWSSDSIPLMLTSLFAVFINHLRSFLLRFTSKSNPNLFVDDVSIASGLAN	58
RHA2b	MCLOGOLS-DWSSDSIPLML ALFATFRHWRSLLLHPSS	48
At1q24580	MCLSHPPRASEGVLPLEVMNRVVSITLLKNMVRSCFOIVASETESSMEIDDEPEDDFVNR	61
RHA 3a	VIR SRLLETAAPPPOPSEEMIAAESDMVVILSALLCALICVAG AAVVRCAWLRFTAGGDSPSPNKGLKK	72
RHA 3b	MTRSSRFLGTASPPP-PEEILAAETDMVVILSALLCALVCVAC AVARCAWLRLTGVNPAAVGEAPPNKGLKK	75
	* * * * * * *	
BRH1	RESALFIRENTEVIKOBBINNSCEDLPENCAYOBYB33GEOBIRWERNCRIIISHISHSCODRWD-EDOKEC91CRII23/2D3	144
At1g63840	AATUAGEMLEVVRESDINRPESECAVGLYDERNDDELERUTNGRHIEHEGLGDRWMGYNOMTGPLGETOFTPDH	140
At5g41400	PVAARLAGETLPVTRESELTRDGFGSGSDCCAVCLHEFBNDDEIRRLINC0HIFHRGLCDRWMMGYNOMTCPLCRTPFISDE	155
RHA1a	ASLANELIEVVRESDLPTDPEDCCTVCLSDEESDDKVROLPKCGHVEHHHCLDRWIVDYNKMKCEVCRHRELPKE	137
RHA1b		136
RHA2a		135
RHA2b	LSVLADQLNLNRLESYRYSDNAASDCIVCLSKLKTGEEVEKED-CRHVEHKQCLEGWLQ-HLNFNCPLCRSELLEHH	123
At1q24580	ISITOFKSLCENTPREEEKGVECCOCGKEREFVSEVSCKHFFH AGONMFG-NNHTPGPYGRSIL	131
RHA 3a	KALOST PRSTFTAAESTSGAAAEEGDSTECALCITDEADGEETRVLPLOGHSEHVEGIDKMLVSRSSCPSCRILTPVR	151
RHA 3b	KALQALPKSTYTASASTAAAADDLPCSSVGDGDSSTECAIGITESSEGEDIRIDPLCSHAFHVAGIDKMLTSRSSCPSCRILVEVK	162
	· · · · · · · · · · · · · · ·	
BRH1	MORPHINGR	170
At1g63840	LOLEFNOR	166
At5g41400	LOVAFNORVASESELLAESN	175
RHA1a	KYTOCDWGSGSDWFSDEVESTN	159
RHA1b	KSTPEDWG-TSDWFRDEVESTN	157
RHA2a	CVSKTORSVERDLISEFSLH	155
RHA2b	HOGHGSDASISAFPLRSTSTASSH	146
At1g24580	-	131
RHA 3a	CDRCGHASTAEMKDQAHR QHEQHHSSTTIPTFLP	186
RHA 3b	CDRCGHHASTAETQVKDQPPH <mark>H</mark> QQHPSQFTSAIIPAFLP	201

В



56. ábra: A BRH1 és homológ *Arabidopsis* RING-H2 proteinek összehasonlítása A: A BRH1 (At3g61460) aminosav-szekvenciájának összehasonlítása az *Arabidopsis* hasonló szerkezetű At1g63840, At5g41400, RHA1a (At4g11370), RHA1b (At4g11360), RHA2a (At1g15100), RHA2b (At2g01150), At1g24580, RHA3a (At2g17450) és RHA3b (At4g35480) proteinjeiével. A maximális egyezést adó illesztéseknél a BRH1-gyel egyező aminosavak sötét háttérrel szerepelnek, a RING-H2 motívum konzervált Cys és His aminosavait csillagok jelzik. Az ábra jobb oldalán a sorvégi aminosavak sorszáma látható. B: Az "A" panelen szereplő, valamint az At5g40250, ATL2 (At3g16720), RHC1a (At2g40830), CIP8 (At5g64920), RHB1a (At4g00335), RHG1a (At5g42940) és RHF1a (At4g14220) RING-H2 proteinek rokonsági viszonyait bemutató kladogram. A zárójelben megadott százalékértékek a BRH1-gyel fennálló aminosavszekvencia egyezés mértékét mutatják.



# 57. ábra: A BRH1 mRNS szintjének BR szabályozása

A: Nyolcnapos, LD körülmények közt MS táptalajon nevelt vad típusú (Col-0) és BRdeficiens (*cpd*) csíranövények *BRH1* transzkriptumai egyórás, 1 μM BL-os (BL), ill. hormonmentes kontroll (ktr) inkubálást követően. Northern-hibridizációs analízis autoradiogramja. B: Nyolcnapos, 1 μM BL-dal (BL), ill. anélkül (ktr) két órán át inkubált BR-inszenzitív (*cbb2*) csíranövények RNS mintáival és *BRH1*-, ill. *UBQ10*-specifikus primerekkel végzett RT-PCR <sup>32</sup>P-jelölt termékeinek autoradiogramja. C: Nyolcnapos vad típusú (Col-0) csíranövények BRH1 mRNS szintjének változása négyórás, 1 μM BL-dal (BL) végzett, ill. hormonmentes kontroll (ktr) kezelés során. Northernhibridizációt követően készült autoradiogram. Az "A" és "B" paneleken bemutatott kísérleteknél a BL-os, ill. kontroll inkubáció a proteinszintézis cikloheximides gátlása mellett történt.

hormonok esetében a négyórás kezelések alatt az mRNS felhalmozódásban nem észleltünk érdemi változást (nem bemutatott adatok). Ez az eredmény a BR szabályozás specifikus voltára utalt.

### 4.4.3. Elicitor-indukált BRH1 expresszió

Az Arabidopsis RING-H2 fehérjék RH csoportjába tartozó proteinek változatossága ellenére ezek funkciói jórészt ismeretlenek voltak. Közülük az ATL2 és ATL6 kitin-indukálhatónak bizonyult (Salinas-Mondragón és mtsai, 1999), ezért az ATL génekkel esetleg fennálló szabályozási, vagy működésbeli kapcsolat felderítése céljából megvizsgáltuk ennek a patogén elicitornak a hatását a *BRH1* kifejeződésére.

RT-PCR analízissel a kitin szuszpenzióval kezelt csíranövényekben gyors, átmeneti *BRH1* indukciót tapasztaltunk, melynek során az mRNS-szint nagyjából háromszoros felhalmozódást mutatott a 45. perc körüli csúccsal, majd a negyedik óráig a kiindulásihoz közeli értékre esett vissza (58. ábra). Az indukció mértéke az *ATL2*-énél kisebb mértékű volt, de időbeni kialakulása és lecsengése azéhoz nagyon hasonlított. Ezzel szemben a szintén gyorsan indukálható bázikus kitináz génjének (*PR3*) transzkriptuma több órán át magas szinten maradt (58. ábra). A kitin mellett teszteltük a patogén reakciókban résztvevő más regulátorok hatását is, de szalicilsav (0,5 mM), jazmonsav (50  $\mu$ M), abszcizinsav (5  $\mu$ M), valamint az etilént felszabadító etefon (100  $\mu$ M) hatására nem észleltünk változást a *BRH1* mRNS felhalmozódásában (nem bemutatott adatok).



## 58. ábra: A BRH1 kitin-indukált kifejeződése

A *BRH1*, valamint a patogén-reszponzív *ATL2* és *PR-2* transzkriptumok kitin általi indukálhatósága nyolcnapos, LD fényciklusban MS médiumon nevelt Col-0 csíranövényekben. A 45 perces, ill. négyórás inkubálás levegőztetett folyékony MS táptalajban, 200 mg/l szuszpendált kitin (kit) mellett, vagy anélkül (ktr) történt. Azonos cDNS mintákkal és génspecifikus primerekkel végzett RT-PCR reakciók <sup>32</sup>P-jelölt termékeinek autoradiogramjai.

#### 4.4.4. A BRH1 expresszió fenotipikus hatása

A *BRH1* kifejeződés hatásának vizsgálatára a gént a karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S promótere által szensz és antiszensz formában expresszáló transzgenikus vonalakat hoztunk létre. A 35S:*BRH1* és az *AS-BRH1*-et gyengén kifejező növények fenotípusa a vad típusétól megkülönböztethetetlen volt, ugyanakkor az erős antiszensz expressziót mutató AS/3 és AS/7 transzformánsok egyedei



#### 59. ábra: Antiszensz BRH1 expresszió transzgenikus Arabidopsisban

A: Vad típusú *Arabidopsis* (Col-0), valamint az antiszensz *BRH1*-et expresszáló AS/3 és AS/7 transzgenikus vonalak 12 napos csíranövényeinek RNS mintáin szálspecifikus szensz (*BRH1*), ill. antiszensz (*As-BRH1*) *BRH1* próbával végzett Northernhibridizációk autoradiogramjai. B: Egyhónapos vad típusú (balra), valamint antiszensz *BRH1*-et kifejező AS/3 (középen) és AS/7 (jobbra) növények. C: Egyhónapos vad típusú (balra), valamint AS/3 transzgenikus növények (jobbra) tőlevelei (alul), ill. virágzati tengelyeikről származó járulékos levelei (felül).

erőteljesebb megjelenésűek voltak, vastagabb virágzati tengellyel, megnagyobbodott járulékos és tőlevelekkel (59. ábra A-C). A transzformálatlan Col-0 egyedekhez viszonyítva ezeknél a transzgenikus növényeknél a tőlevelek szélesebbek, lekerekítettebbek, a virágzati tengely járulékos levelei nagyobbak, fogazottabbak voltak. A sziklevelek és levelek kiterültebb, kerekdedebb alakját már csíranövénykorban észlelni lehetett. Nem látszott viszont különbség a virágok morfológiájában, és a virágzási időben sem.

143

### 4.4.5. A BRH1 lehetséges funkciója

A fitohormonok fontos szerepet játszanak a külső és belső eredetű stimulusokra adandó válaszreakcióknak a szövetek és szervek szintjén történő összehangolásában. Bár a BR-ok jelentősége számos alapvető életfolyamatban ismert volt, munkánk idején csak a bioszintézisükhöz és sejtmegnyúlási folyamatokhoz szükséges gének BR-reguláltságáról lehetett tudni, de a hormon szabályozó funkciókra gyakorolt hatása ismeretlen volt (Bishop és Yokota, 2001). Tekintettel arra, hogy a RING-H2 proteint kódoló *BRH1* kifejeződése BR hatásra elsődleges hormonválaszként represszálódott, feltételezhető volt, hogy valamilyen sejtszintű regulációs folyamatban vesz részt. A *BRH1* cDNS szintjét a BR-ok a BRI1 receptoron keresztül szabályozzák. Mivel ehhez *de novo* fehérjeszintézis nem szükséges, feltételezhető, hogy ez a kontroll alapvetően a transzkripció szintjén történik.

A DD RT-PCR szűrés során feltűnő volt BR-szabályozott mRNS-ek alacsony száma, és szintjük változásának kis mértéke. A BR hatás későbbi széleskörű transzkripciós vizsgálata ugyanakkor megerősítette az így szabályozott gének alacsony arányát és kifejeződésük szokatlanul kismértékű (túlnyomóan kisebb, mint kétszeres) változását (Vert és mtsai, 2005).

A RING-finger proteinek nagyfokú strukturális változatossága ellenére legtöbbjük valamilyen molekuláris szintű specificitási faktorként járult hozzá több komponensű fehérjekomplexek kialakításához (Borden, 2000). Eukariota szervezetekben számos képviselőjük vett részt célzott ubikvitinációs folyamatokban, akár mint autonóm E3 ubikvitin-ligázok, akár mint több alegységes E3 komplexek esszenciális elemei (Joazeiro és Weissman, 2000). Növényekben a legismertebb motívumot hordozó protein a fotomorfogenezis központi szabályozójának tekintett COP1, amely sötétben önálló E3 ligázként a HY5 transzkripciós faktorhoz kapcsolódva idézi elő annak ubikvitinációját, és ezáltal a 26S proteoszómán keresztüli proteolitikus lebontását (Osterlund és mtsai, 2000). Más RING proteinek több alegységes E3 komplexek stabilizáló komponenseként funkcionálnak, például az SCF típusú ubikvitin ligázokban. Ezek közül az SCF<sup>TR1</sup> az auxin hatás közvetítője. Ez az auxin receptor TIR1 és a RING-H2 tartalmú RBX1 faktor által stabilizált E3 a 26S proteoszómához juttatja a hormonhatás gátlásáért felelős regulátor elemeket (Schwechheimer és mtsai, 2001), mint utóbb tisztázódott, elsősorban IAA típusú transzkripciós represszorokat (Badescu és Napier, 2006). Az SCF komplexek szubsztrát-specificitása elsősorban a hozzájuk közvetlenül kötődő ún. F-box proteineknek tulajdonítható, amelyek az *Arabidopsis* genomban több mint 330 taggal vannak képviselve (Xiao és Jang, 2000). A csupán egy RING-H2 elemet és egy hidrofób domént tartalmazó RBX1 egyszerű szerkezete ellenére az F-box mellett még további két alegységgel képes intramolekuláris kapcsolat kialakítására az SCF<sup>TIR1</sup> összeszerelődése során. Bár a RING proteinek szerepe lényegesen változatosabb lehet, mint az ubikvitinációban való részvétel, génjeik gyakorisága alapján igen sokféle E3 enzim létrehozására lehetnek alkalmasak. Az ismert RING mutánsok alacsony száma ugyanakkor ezen ubikvitin ligázok szerepének számottevő redundanciájára utal.

A BRH1-hez hasonlóan egyszerű szerkezetű RING-H2 fehérjék biológiai szerepéről igen keveset lehetett tudni. A szintén csak RING-H2 és hidrofób doménekből felépülő, kevesebb, mint 350 aminosavnyi ATL2-ről ismert volt, hogy patogén elicitorok hatására gyorsan indukálható (Salinas-Mondragón és mtsai, 1999). Ujabb vizsgálatok alapján már valamivel több tudható a kis RING-H2 fehérjék működéséről. Élesztő rendszerben végzett funkcionális analízis eredményeként valószínűsíteni lehetett, hogy az ATL2 is ubikvitin-ligáz alegységként működik (Aguilar-Henonin és mtsai, 2006). A hasonló struktúrájú, szintén patogén-indukálható és a jazmonsav jelátvitelt felerősítő ATL6 hatását szintén az ubikvitináción keresztül fejti ki (Hondo és mtsai, 2007). A 162 aminosavból álló XERICO egy SCF típusú ligáz alegysége, amely az abszcizinsav szintézis szabályozásán keresztül befolyásolja az Arabidopsis szárazságtűrését. Túltermeltetése a transzgenikus növényekben az etilén, gibberellin és BR bioszintézis génjeinek expressziójában is jelentős változásokat okozott (Ko és mtsai, 2006). A BRH1-gyel viszonylag közeli rokonságot mutató RHA2a (56. ábra B) E3 ligázként az abszcizinsav szignálút pozitív szabályozójának bizonyult (Bu és mtsai, 2009). Általában is elmondható, hogy az ubikvitináción keresztüli hormonszint szabályozásnak meghatározó szerepe van a növények biotikus stresszhatásokkal szembeni reakcióinak kialakításában (Dreher és Callis, 2007). Mindezek, valamint a BR-ok stresszválaszokban játszott szerepe (saját adataink; Nakashita és mtsai, 2003) alapján feltételezhető, hogy a BRH1 valamilyen több alegységes E3 komplex tagjaként elicitor-indukált és BR-ok által mediált védekezési reakciókban vehet részt.

Amennyiben a BRH1 szabályozó proteinek szelektív degradációjában vesz részt, elképzelhető, hogy a BR-ok csökkentík, patogén elicitorok pedig fokozzák ezt a hatást. A *BRH1* mRNS kitin-indukált felhalmozódása az *ATL2* és *PR3* válaszokhoz hasonlóan gyors volt. A *BRH1* promóter szekvenciájának proximális 500 bp-os

régiójában négy olyan ún. W-box motívum is fellelhető volt, amelyek a kitin-reszponzív kifejeződésért felelősek lehetnek. Ez az eredetileg sebzésindukált expresszió kapcsán azonosított szabályozó elem többféle patogén, köztük gombák által kiváltott védekező reakciók kiváltásában is fontos szerepet játszik (Raventos és mtsai, 1995).

A BRH1 túltermeltetése transzgenikus *Arabidopsis*ban - talán az eleve magas *BRH1* transzkripciós alapaktivitás miatt - nem adott észlelhető fenotipikus változást. Az *AS-BRH1* transzkriptum felhalmozódása mellett viszont erőteljesebb növekedés és nagyobb levélméret volt megfigyelhető, ami eredhet például a BR-ok, vagy akár több más növekedés-serkentő hormon hatását befolyásoló változásokból. Nem zárható ki ugyanis, hogy RING-H2 szekvenciák nagyfokú helyi homológiái miatt az antiszensz szuppressziós hatás a *BRH1* mellett a közeli rokon gének kifejeződésére is gátlólag hatott.

### 5. ÖSSZEFOGLALÁS

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 monooxigenáz a BR bioszintézis esszenciális enzime. A hiánymutáns fenotípusának részletes vizsgálatával pontosítottuk és kibővítettük a BR-ok hatásspektrumára vonatkozó ismereteket.

(2) Meghatároztuk a *CPD* gén szervspecifikus kifejeződési mintázatát, és kimutattuk, hogy expresszióját egy BR koncentrációtól függő, transzkripciós szinten működő negatív visszacsatolási mechanizmus is szabályozza.

(3) Génexpressziós vizsgálataink alapján megállapítható volt, hogy a BR bioszintézisben résztvevő valamennyi P450 enzim génje összehangolt, a *CPD*-ével azonos mechanizmuson alapuló végtermékgátlásos szabályozás alatt áll.

(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. Paradicsomban *Dwarf* indukciót, és ezzel párhuzamosan erőteljes átmeneti BL 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 fitokróm rendszeren keresztüli fényszabályozás együttes kontrollja biztosítja. Megállapítottuk, hogy a bioszintetikus gének reggeli indukcióját a növényekben erős, tranziens BL felhalmozódás követi.

(6) Genetikai és biokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy az Arabidopsis CYP90C1 és CYP90D1 enzimei redundáns szerepű szteroid C-23 hidroxilázok. Szubsztrát-preferenciáik alapján és korábban ismeretlen intermedierek detektálásával egy olyan új, enzimológiai adatokra alapozott bioszintetikus sémát vezettünk le, amelyben C-23 hidroxilációs söntök révén a BL a korábbi modellben feltételezettnél kevesebb lépésben jöhet létre.

(7) DD RT-PCR szűréssel azonosítottuk a BR hatásra korai válaszként represszálódó, kitin által indukálható BRH1 gént, amely egy ismeretlen funkciójú, feltehetően a patogén és BR szignálutak kapcsolatát biztosító ubikvitinációs szabályozásban résztvevő RING-H2 proteint kódol.

Eredmények kapcsán sokszor újabb megválaszolandó kérdéseket merültek fel. Többszörös bioszintetikus mutánsok és a *CPD* mRNS-t túltermelő transzgén felhasználásával jelenleg is dolgozunk a CYP90A1 enzim pontos szerepének tisztázásán. Ugyancsak jelenlegi vizsgálataink tárgya annak felderítése, hogy a *CPD* és *CYP85A2* mRNS-ek napszakos reguláltsága milyen mértékben hat enzim termékeik szintjének alakulására, és ezáltal a BR bioszintézis hatékonyságára. Tekintettel a lokális BR felhalmozódás és egyes - főként reproduktív szerveket érintő - morfogenikus folyamatok közötti közvetlen kapcsolatra, tervezzük a hormonszint változásainak *in vivo* kimutatására alkalmas riporter rendszer kialakítását is. Reményeink szerint mindezekkel hozzájárulhatunk az intenzíven folyó és igen kompetitív BR kutatások további fejlődéséhez.

# 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Öszinte 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 munkatársénak, 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 hátteret teremtett családom támogatása, amit ezúton is szeretnék megköszönni.

#### 7. IRODALOMJEGYZÉK

Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. Plant Physiol 111: 9-17

Adam G, Porzel A, Schmidt J, Schneider B, Voigt B (1996) New developments in brassinosteroid reserch. In: Studies in Natural Products Chemistry, 18 (ST Atta-ur-Rahman, ed), 495-549, Elsevier, Amsterdam

Aguilar-Henonin L, Bravo J, Guzmán P (2006) Genetic interactions of a putative *Arabidopsis thaliana* ubiquitin-ligase with components of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitination machinery. Curr Genet 50: 257-268

Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y (1999) Regulation of gibberellin 20oxidase and gibberellin 3β-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. Plant Physiol 121: 783-791

Alabadí D, Gil J, Blázquez MA, García-Martínez JL (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. Plant Physiol 134: 1050-1057

Altmann T (1998) A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. Trends Genet 14: 490-495

Altmann T (1999) Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. Planta 208: 1-11

Altmann T, Felix G, Jessop A, Kauscmann A, Uwer U, Peña-Cotrés, Willmitzer L (1995) *Ac/Ds* transposon mutagenesis in *Atabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of *Ds* insertion mutants. Mol Gen Genet 247: 646-652

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410

Asakawa S, Abe H, Nishikawa N, Natsume M, Koshioka M (1996) Purification and identification of new acyl-conjugated teasterones in lily pollen. Biosci Biotech Biochem 60: 1416-1420

Ashikari M, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Datta S, Ishiyama , Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M (2002) Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase (*GA20ox-2*), led to the rice 'green revolution'. Breeding Sci 52: 143-150

Azpiroz R, Wu YW, LoCascio JC, Feldmann KA (1998) An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. Plant Cell 10: 219-230

Badescu GO, Napier RM (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? Trends Plant Sci 11: 217-223

Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiol Biochem 47: 1-8

Bajguz A, Tretyn A (2003) The chemical structures and occurrence of brassinosteroids in plants. In: Brassinosteroids (S. Hayat, A. Ahmad, eds), 1-44, Kluwer, Dordrecht

Belkhadir Y, Chory J (2006) Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. Science 314: 1410-1411

Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics 19: 137-144

Bishop GJ (2003) Brassinosteroid mutants of crops. J Plant Growth Regul 22: 325-335

Bishop GJ (2007) Refining the plant steroid hormone biosynthesis pathway. Trends Plant Sci 12: 377-380

Bishop GJ, Yokota T (2001) Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. Plant Cell Physiol 42: 114-120

Bishop GJ, Harrison K, Jones JDG (1996) The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. Plant Cell 8: 959-969

Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 96: 1761-1766

Blázquez MA, Trénor M, Weigel D (2002) Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in Arabidopsis. Plant Physiol 130: 1770-1775

Borden KLB (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? J Mol Biol 295:1103-1112

Braam J, Davis RW (1990) Rain- and touch-induced expression of calmodulin-related genes in Arabidopsis. Cell 60: 357-364

Brosa C, Capdevila JM, Zamora I (1996) Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements. Tetrahedron: 52: 2435-2448

Bu Q, Li H, Zhao Q, Jiang H, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Wang D, Li C (2009) The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. Plant Physiol 150: 463-481

Cao H, Chen S (1995) Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to indole-3acetic acid and ethylene. Plant Growth Regul 16: 189-196

Cao SQ, Xu QT, Cao YJ, Qian K, An K, Zhu Y, Hu BZ, Zhao HF, Kuai BK (2005) Loss-of-function mutations in *DET*<sub>2</sub> gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*. Physiol Plantarum 123: 57-66

Carrera E, Jackson SD, Prat S (1999) Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. Plant Physiol 119:765-774

Chapple C (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 311-343

Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998) The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome-P450 that mediates multiple 22α-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. Plant Cell 10: 231-243

Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann K (2001) Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. Plant J 26: 573-582

Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee M-O, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE (2002) Arabidopsis brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase  $3(\beta)$ -like kinase. Plant Physiol 130: 1506-1515

Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A (1997) An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. Phytochemistry 44: 609-613

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159

Chory J (1993) Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. Trends Genet 9: 167-172

Chory J, Nagpal P, Peto C (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. Plant Cell 3: 445-459

Church, GM, Gilbert W (1984). Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1991-1995

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16: 735-743

Clouse SD (1996a) Plant hormones: Brassinosteroids in the spotlight. Curr Biol 6: 658-661

Clouse SD (1996b) Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. Plant J 10: 1-8

Clouse SD, Sasse JM (1998) Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 427-451

Clouse SD, Hall AF, Langford M, McMorris TC, Baker ME (1993) Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. J Plant Growth Regul 12: 61-66

Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. Plant Physiol 111: 671-678

Covington MF, Harmer SL (2007) The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. PLoS Biol 5: e222

Deng XW (1994) Fresh view of light signal transduction in plants. Cell 76: 423-426

Dodd, AN, Salathia N, Hall A, Kevei É, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science 309: 630-633

Domagalska MA, Schomburg FM, Amasino RM, Vierstra RD, Nagy F, Davis SJ (2007) Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering. Development 134: 2841-2850

Dowson-Day MJ, Millar AJ (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in Arabidopsis. Plat J 17: 63-71

Dreher K, Callis J (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. Ann Botany 99: 787-822

Durst F, Nelson DR (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. Drug Metabol Drug Interact 12: 189-206

Edwards KD, Anderson PE, Hall A, Salathia NS, Locke JCW, Lynn JR, Straume M, Smith JQ, Millar AJ (2006) *FLOWERING LOCUS C* mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Cell 18: 639-650

Ehsan H, Ray WK, Phinney B, Wang X, Huber SC, Clouse SD (2005) Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein. Plant J 43: 251-261

Ephritikhine G, Pagant S, Fujioka S, Takatsuto S, Lapous D, Caboche M, Kendrick RE, Barbier-Brygoo H (1999) The *sax1* mutation defines a new locus involved in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 18: 315-320

Feldmann KA (1991) T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: Mutational spectrum. Plant J 1: 71-82

Feldmann KA, Marks MD, Christianson ML, Quatrano RS (1989) A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. Science 243: 1351-1354

Foster KR, Morgan PW (1995) Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. The  $ma_3^R$  allele disrupts diurnal control of gibberellin biosynthesis. Plant Physiol 108: 337-342

Fu FQ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Asami T, Yu JQ (2008) A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. J Exp Bot 59: 2299-2308

Fujioka S, Sakurai A (1997) Brassinosteroids. Natural Prod Rep 14: 1-10

Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. Annu Rev Plant Biol 54: 137-164 Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T, Sakurai A (1995a). Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone. Biosci Biotech Biochem 59: 1543-1547

Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T. Sakurai A (1995b) Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide. Biosci Biotech Biochem 59: 1973-1975

Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, Sakurai A (1997) The *Arabidopsis de-etiolated 2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. Plant Cell 9: 1951-1962

Fujioka S, Noguchi T, Yokota T, Takatsuto S, Yoshida S (1998) Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 48: 595-599

Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S (2002) An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. Plant Physiol 130: 930-939

Fujita S, Ohnishi T, Watanabe B, Yokota T, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S, Sakata K, Mizutani M (2006) Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub>, sterols. Plant J 45: 765-774

Fukuda H (1997) Tracheary element differentiation. Plant Cell 9: 1147-1156

Fukuta N, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuta Y, Nakayama M (2004) 'Rinrei', a brassinosteroiddeficient dwarf mutant of faba bean (*Vicia faba*). Physiol Plantarum 121: 506-512

Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. Genes Dev 21: 1598-1602

Giovannoni JJ (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 725-749

Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant Cell 16: S170-S180

Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S (2002) Microarray analysis of brassinosteroidregulated genes in Arabidopsis. Plant Physiol 130: 1319-1334

Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S (2004a) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. Plant Physiol 134: 1555-1573

Goda H, Shimada Y, Fujioka S, Yoshida S (2004b) Classification of brassinosteroid-regulated genes based on expression profiles in *bri1* and in response to a protein kinase inhibitor, staurosporin. Biosci Biotechnol Biochem 68:1605-1607

Gray WM, Estelle M (2000) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. Trends Biochem Sci 25: 133-138

Green RM, Tobin EM (1999) Loss of circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 96: 4176-4179

Gregory LE, Mandava NB (1982) The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. Physiol Plant 54: 239-243

Groot SPC, Bruinsma J, Karssen CM (1987) The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato - studies with a gibberellin-deficient mutant. Physiol Plant 71: 184-190

Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. Nature 281: 216-217

Gyula P, Schäfer E, Nagy F (2003) Light perception and signalling in higher plants. Curr Opin Plant Biol 6: 446-452

Harmer SL, Kay SA (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis. Plant Cell 17: 1926-1940

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han Z, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. Science 290: 2110-2113

He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 99:10185-10190

He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. Science 307: 1634-1638

Helliwell CA, Chandler PM, Poole A, Dennis ES, Peacock WJ (2001) The CYP88A cytochrome P450, entkaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci USA 98: 2065-2070

Highkin HR, Hanson JB (1954) Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. Plant Physiol 29: 301-302

Hondo D, Hase S, Kanayama Y, Yoshikawa N, Takenaka S, Takahashi H (2007) The LeATL6-associated ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato. Molec Plant Micr Interact 20: 72-81

Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2002) Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. Plant J 32: 495-508

Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2003) A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (*d*2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. Plant Cell 15: 2900-2910

Hooley R (1996) Plantnt steroid hormones emerge from the dark. Trends in Genet 12: 281-283

Jackson SD, James PE, Carrera E, Prat S, Thomas B (2000) Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. Plant Physiol 124: 423-430

Jager CE, Symons GM, Nomura T, Yamada Y, Smith JJ, Yamaguchi S, Kamiya Y, Weller JL, Yokota T, Reid JB (2007) Characterisation of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea. Plant Physiol 143: 1894-1904

James MO (1989) Cytochrome P450 monooxigenases in crustaceans. Xenobiotica 19: 1063-1076

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep 5: 387-405

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907

Jensen RB, Jensen KL, Jespersen HM, Skriver K (1998) Widespread occurrence of a highly conserved RING-H2 zinc finger motif in the model plant *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 436:283-287

Joazeiro CA, Weissman AM (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell 102:549-552

Jones JDG, Shlumukov L, Carland F, English J, Scofield SR Bishop GJ, Harrison K (1992) Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. Transgenic Res 1: 285-297

Jorgensen K, Rasmussen AV, Morant M, Nielsen AH, Gjarnholt N, Zagrobelny M, Bak S, Moller BL (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 280-291 Jouve L, Gaspar T, Kevers C, Greppin H, Degli Agosti R (1999) Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of Arabidopsis. Planta 209: 136-142

Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta 225: 353-364

Kamuro Y, Takatsuto S (1999) Practical application of brassinosteroids in agricultural fields. In: Brassinosteroids: steroidal plant hormones. (A Sakurai, T Yokota, SD Clouse, eds), pp 223-241, Springer, Tokyo

Kang JG, Yun J, Kim DH, Chung KS, Fujioka S, Kim JI, Dae HW, Yoshida S, Takatsuto S, Song PS, Park CM (2001) Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. Cell 105: 625-636

Katsumata T, Hasegawa A, Fujiwara T, Komatsu T, Notomi M, Abe H, Natsume M, Kawaide H (2008) Arabidopsis CYP85A2 catalyzes lactonization reactions in the biosynthesis of 2-deoxy-7-oxalactone brassinosteroids. Biosci Biotech Biochem 72: 2110-2117

Khripach VA, Zhabinskii VV, Khripach NB (2003) New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. In: Brassinosteroids (S Hayat, A Ahmad, eds), 189-230, Kluwer, Dordrecht

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. Cell 72: 427-441

Kim BK, Fujioka S, Takatsuto S, Tsujimoto M, Choe S (2008) Castasterone is a likely end product of brassinosteroid biosynthetic pathway in rice. Biochem Biophys Res Comm 374: 614-619

Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H (1998) The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. Genes Dev 12: 2381-2391

Kim GT, Tsukaya H, Saito Y, Uchimiya H (1999) Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9433-9437

Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H (2005) CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 41: 710-721

Kim HB, Kwon M, Ryu H, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, An CS, Lee I, Hwang I, Choe S (2006) The regulation of *DWARF4* expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 140: 548-557

Kim TW, Hwang JY, Kim YS, Joo SH, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Kim SK (2005) Arabidopsis CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. Plant Cell 17: 2397-2412

Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, Chory J (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. Nature 433: 167-171

Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH (1998) The *Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. Plant Cell 10: 1677-1690

Klarsfeld A, Rouyer F (1998) Effects on circadian mutations and LD periodicity on the life span of Drosophila melanogaster. J Biol Rhythms 13: 471-478

Ko JH, Yang SH, Han KH (2006) Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. Plnt J 47: 343-35

Koka CV, Cerny RE, Gardner RG, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Clouse S (2000) A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL3* in brassinosteroid biosynthesis and response. Plant Physiol 122: 85-98

Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kálmán Z, Körber H, Rédei GP, Schell J (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8467-8471

Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J (1992) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol 20: 963-976

Koncz C, Martini N, Szabados L, Hrouda M, Brachmair A, Schell J (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: Plant Molecular Biology Manual (SB Gelvin, AR Schilperoort, eds) B2, 1-22, Kluwer, Dordecht

Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure by mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J 4: 403-410

Koornneef M, van der Veen JH (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*. Theor Appl Genet 58: 257-263

Koornneef M, Elgersma A, Hanhart CJ, van Loenen/Martinet EP, van Rijn L, Zeevaart JAD (1985) A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. Physio Plant 65: 33-39

Krishna P (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. J Plant Growth Regul 22: 289-297

Kwon M, Fujioka S, Jeon JH, Kim HB, Takatsuto S, Yoshida S, An CS, Choe S (2005) A double mutant for the *CYP85A1* and *CYP85A2* genes of *Arabidopsis* exhibits a brassinosteroid dwarf phenotype. J Plant Biol 48: 237-244

Lanahan M.B, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994) The *never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. Plant Cell 6: 521-530

Lee DJ, Zeevaart JAD (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. Plant Physiol 130: 2085-2094

Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. Cell 110: 213-222

Li JM, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. Cell 90: 929-938

Li JM, Jin H (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. Trends Plant Sci 12: 37-41

Li JM, Nam KH (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. Science 295: 1299-1301

Li JM, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. Science 272: 398-401

Li L, Deng XW (2005) It runs in the family: Regulation of brasinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors. Trends Plant Sci 10: 266-268

Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971

Liu T, Zhang J, Wang M, Wang Z, Li G, Qu L, Wang G (2007) Expression and functional analysis of *ZmDWF4*, an ortholog of *Arabidopsis DWF4* from maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep 26: 2091-2099

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. Plant J 28: 465-474

Luo M, Xiao Y, Li X, Lu X, Deng W, Li D, Hou L, Hu M, Li Y, Pei Y (2007) GhDET2, a steroid 5α-reductase, plays an important role in cotton fiber cell initiation and elongation. Plant J 51: 419-430

Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng XW (2001) Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. Plant Cell 13: 2589-2607

Mandava NB (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 23-52

Mandava NB, Sasse JM, Yopp JH (1981) Brassinolide, a growth promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. Physiol Plant 53: 453-461

Mayer R, Raventos D, Chua NH (1996) *det1, cop1* and *cop9* mutations cause inappropriate expression of several gene sets. Plant Cell 8: 1951-1959

Medford JI, Elmer JS, Klee HJ (1991) Molecular cloning and characterisation of genes expressed in shoot apical meristems. Plant Cell 3: 359-370

Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA, Chory J (2008) A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. PLOS Biol 6: e225

Millar AJ, Short SR, Chua NH, Kay SA (1992a) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Cell 4: 1075-1087

Millar AJ, Short SR, Hiratsuka K, Chua NH, Kay SA (1992b) Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. Plant Mol Biol Rep 10: 324-337

Mitchell JW, Livingston GA (1968) Methods of sudying plant hormones and growth-regulating substances. Agricultural handbook 36, Agric Res Ser USDA

Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR (1970) Brassins - a new family of plant hormones from rape pollen. Nature 225: 398-401

Mizutani M, Ohta D (1998) Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. Plant Physiol 116: 357-367

Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T, Bishop GJ (2002) Cloning of the tomato *Curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. Plant Cell 14: 3163-3176

Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, Cano-Delgado A, Cheong H, Chory J (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. Genes Dev 18: 448-460

Mori M, Nomura T, Ooka H, Ishizaka M, Yokota T, Sugimoto K, Okabe K, Kajiwara H, Satoh K, Yamamoto K, Hirochika H, Kikuchi S (2002) Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis. Plant Physiol 130:1152-1161

Mouchel CF, Osmont KS, Hardtke CS (2006) *BRX* mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. Nature 443: 458-461

Mushegian AR, Koonin EV (1995) A putative FAD-binding domain in a distinct group of oxidases including a protein involved in plant development. Protein Sci 4: 1243-1244

Müssig C, Fischer S, Altmann T (2002) Brassinosteroid-regulated gene expression. Plant Physiol 129: 1241-1251

Nagatani A, Nakamura M, Yokota T, Tanaka S, Mochizuki N (1998) Light-responses of plants and phytohormones. Plant Cell Physiol 39: s9

Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshiba T, Shimada Y, Yoshida S (2003) Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19*, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. Plant Physiol 133: 1843-1853

Nakamura M, Satoh T, Tanaka SI, Mochizuki N, Yokota T, Nagatani A (2005) Activation of the cytochrome P450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*. J Exp Bot 56: 833-840

Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Akai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. Plant J 33: 887-898

Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. Plant Physiol 118: 1295-1305

Nam KH, Li JM (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell 110: 203-212

Nam KH, Li JM (2004) The Arabidopsis transthyretin-like protein is a potential substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1. Plant Cell 16: 2406-2417

Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. DNA Cell Biol 1-14

Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J (1999) *BAS1*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 15316-15323

Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004) Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. Plant Physiol 135: 756-772

Nester JE, Zeevaart JAD (1988) Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (*Ga-2*) mutant. Am J Bot 75: 45-55

Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE (1999a) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. Plant Physiol 121: 743-752

Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yoshida S, Li JM, Chory J (1999b) *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 alpha-cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. Plant Physiol 120: 833-839

Nomura T, Bishop GJ (2006) Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. Phytochem Rev 5: 421-432

Nomura T, Nakayama M, Reid JB, Takeuchi Y, Yokota T (1997) Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. Plant Physiol 113: 31-37

Nomura T, Sato T, Bishop GJ, Kamiya Y, Takatsuto S, Yokota T (2001) Accumulation of 6deoxocathasterone and 6-deoxocastasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. Phytochemistry 57: 171-178

Nomura T, Jager CE, Kitasaka Y, Takeuchi K, Fukami M, Yoneyama K, Matsushita Y, Nyunoya H, Takatsuto S, Fujioka S, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Reid JB, Yokota T (2004) Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid  $5\alpha$ -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea. Plant Physiol 135:2220-2229

Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S (2005) The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. J Biol Chem 280: 17873-17879

Nomura T, Ueno M, Yamada Y, Takatsuto S, Takeuchi Y, Yokota T (2007) Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination. Plant Physiol 143: 1680-1688

Nozue K, Maloof JN (2006) Diurnal regulation of plant growth. Plant Cell Environ 29: 396-408

Ogweno JO, Song XS, Shi K, Hu WH, Mao WH, Zhou YH, Yu JQ, Nogués S (2008) Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant synthesis in *Lycopersicon esculentum*. J Plant Growth Reg 27: 49-57

Ohnishi Y, Watanabe B, Sakata K, Mizutani M (2006a) CYP724B2 and CYP90B3 function in the early C-22 hydroxylation steps of brassinosteroid biosynthetic pathway in tomato. Biosci Biotechnol Biochem 70: 2071-2080

Ohnishi Y, Nomuta T, Watanabe B, Ohta D, Yokota T, Miyagawa H, Sakata K, Mizutani M (2006b) Tomato cytochrome P450 CYP734A7 functions in brassinosteroid catabolism. Phytochemistry 67: 1895-1906

Ohnishi T, Bancos S, Watanabe B, Fujioka S, Yokota T, Sakata K, Szekeres M, Mizutani M (2007) Biochemical characterization of brassinosteroid C-3 oxidase. Plant Cell Physiol 48: S200

Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. Nature 405:462-466

Ouyang Y, Andersson, CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA 95: 8660-8664

Pan Y, Michael TP, Hudson ME, Kay SA, Chory J, Schuler MA (2009) Cytochrome P450s as reporters for circadian-regulated pathways. Plant Physiol 150: 858-878

Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature 400: 256-261

Phillips AL, Hutty AK (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from Arabidopsis thaliana by subtractive hybridization: expression of the tonoplast wayer channel,  $\gamma$ -*TIP*, is increased by GA<sub>3</sub>. Plant Mol Biol 24: 603-615

Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. Plant Physiol 108: 1049-1057

Pien S, Wyrzykowska J, Fleming AJ (2001) Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. Plant J 25: 663-674

Pierik R, Cuppens MLC, Voesenek LACJ, and Eric J.W. Visser EJW (2004) Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco Plant Physiol 136: 2928-2936

Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. Proc Natl Acad Sci USA. 102: 15253-15258

Puente P, Wei N, Deng XW (1996) Combinational interplay of promoter elements constitutes the minimal determinations for light anf developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. EMBO J 15: 3732-3743

Raventos D, Jensen AB, Rask M-B, Casacuberta JM, Mundy J, San Segundo B (1995) A 20 bp cis-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize PRms gene. Plant J 7:147-156

Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. Plant Physiol 104: 1139-1149

Reed JW, Foster KR, Morgan PW, Chory J (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in Arabidopsis. Plant Physiol 112: 337-342

Ríos G, Lossow A, Hertel B, Bauer F, Schaefer S, Broich M, Kleinow T, Jásik J, Winter J, Ferrando A, Farrás R, Panicot M, Henriques R, Mariaux J-B, Oberschall A, Molnár G, Berendzen K, Shukla V, Lafos M, Koncz Z, Rédei GP, Schell J, Koncz C (2002) Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. Plant J 32: 243-253

Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Saez A, Osmont KS, Gadea J, Hardtke CS, Rodriguez PL (2009) The short-rooted phenotype of the brevis radix mutant partly reflects root ABA hypersensitivity. Plant Physiol 149: 1917-1928

Rosati F, Bardazzi I, De Blasi P, Simi L, Scarpi D, Guarna A, Serio M, Racchi M.L., Danza G (2005) 5αreductase activity in *Lycopersicon esculentum*: Cloning and functional characterization of *LeDET2* and evidence of the presence of two isoenzymes. J Steroid Biochem Mol Biol 96: 287-299

Rouleau M, Marsolais F, Richard M, Nicolle L, Voigt B, Adam G, Varin L (1999) Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. J Biol Chem 274: 20925-20930

Russell DW (1996) Green light for steroid hormones. Science 272: 370-371

Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. Plant Cell 19: 2749-2762

Saisho D, Tanno K, Chono M, Honda I, Kitano H, Takeda K (2004) Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutants 'uzu' adapted to East Asia. Breeding Sci 54: 409-416

Sakamoto T, Matsuoka M (2006) Characterization of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM homologs in rice (Oryza sativa L.). J Plant Growth Regul 25: 245-251

Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. Nature Biotechnol 24: 105-109

Sakurai A, Fujioka S (1993) The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. Plant Growth Regul 13: 147-159

Salinas-Mondragón R, Garciduenas-Pina C, Guzmán P (1999) Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 40:579-590

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Saunders DS (1972) Circadian control of larval growth rate in *Sarcophaga argyrostoma*. Proc Natl Acad Sci USA 69: 2738-274

Saurin, AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS (1996) Does this have a familiar RING? Trends Biochem Sci 21:208-214

Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. Nature 446: 199-202

Schaeffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 13: 113-123

Schuler M, Duan H, Bilgin M, Shahjahan A (2006) *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a vindow on plant biochemistry. Phytochem Rev 5: 205-237

Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF<sup>TIR1</sup> in mediating auxin response. Science 292:1379-1382

Sharrock RA, Clack T (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. Plant Physiol 130: 442-456

Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S (2001) Brassinosteroid-6-oxidases from Arabidopsis and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. Plant Physiol 126: 770-779

Shimada Y, Goda H, Nakamura A, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S (2003) Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in Arabidopsis. Plant Physiol 131: 287-297

Silverstone AL, Sun T (2000) Gibberellins and Green Revolution. Trends Plant Sci 5: 1-2

Steber CM, McCourt P (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. Plant Physiol 125: 763-769

Sullivan JA, Deng XW (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. Dev Biol 260: 289-29

Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Sakurai A (1994) Biosynthesis of brassinolide from teasterone via typhasterol and castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus*. J Plant Growth Regul 13: 21-26

Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Sakurai A (1995) Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Oryza sativa*. Biosci Biotech Biochem 59: 168-172

Suzuki Y, Saso K, Fujioka S, Yoshida S, Nitasaka E, Nagata S, Nagasawa H, Takatsuto S, Yamaguchi I (2003) A dwarf mutant of *Pharbitis nil*, Uzokobito (kobito), has defective brassinosteroid biosynthesis. Plant J 36: 401-410

Symons GM, Reid JB (2003) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. Planta 216: 422-431

Symons GM, Reid JB (2004) Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. Plant Physiol 135: 2196-2206

Symons GM, Schultz L, Kerckhoffs LH, Davies NW, Gregory D, Reid JB (2002) Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. Physiol Plant 115: 311-319

Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. Plant Physiol 140: 150-158

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

Takahashi N, Nakazawa M, Shibata K, Yokota T, Ishikawa A, Suzuki K, Kawashima M, Ichikawa T, Shimada H, Matsui M (2005) *shk1-D*, a dwarf Arabidopsis mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels. Plant J 42: 13-22

Takahashi T, Gasch A, Nishizawa N, Chua NH (1995) The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. Genes Devel 9: 97-107

Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005) Brassinosteroid homeostasis in Arabidopsis is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. Plant Physiol 138: 1117-1125

Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJJ, Dowson-Day MJ, Wang Z-Y, Tobin EM, Harren FJM, Millar AJ, Van Der Straeten D (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in Arabidopsis. Plant Physiol 136: 3751-3761

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408: 796-815

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acids Res 22: 4673-4680

Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. Plant Physiol 118: 1517-1523

Tsuge T, Tsukaya H, Uchimiya H (1996) Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Development 122: 1589-1600

Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Denzel MA, Torres QI, Neff MM (2003) CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. Plant Physiol 133: 1643-1653

Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres QI, Ward JM, Murthy G, Zhang J, Walker JC, Neff MM (2005) *BAS1* and *SOB7* act redundantly to modulate Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. Plant J 42: 23-34

Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. Annu Rev Cell Dev Biol 21: 177-201

Wada K, Marumo S (1981) Synthesis and plant growth-promoting activity of brassinolide analogues. Agric Biol Chem 45: 2579-2585

Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. Dev Cell 2: 505-513

Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal- transduction encoded by never-ripe. Science 270: 1807- 1809

Wilson AK, Pickett BF, Turner JC, Estelle M (1990) A mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. Mol Gen Genet 222: 377-383

Winkel BS (2004) Metabolic channeling in plants. Annu Rev Plant Biol 55: 85-107

Winkler RG, Helentjaris T (1995) The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. Plant Cell 7: 1307-1317

Xiao W, Jang JC (2000) F-box proteins in Arabidopsis. Trends Plant Sci 5:454-457

Yamaguchi S, Kamiya Y (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. Plant Cell Physiol 41: 251-257

Yamaguchi S, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y, Sun TP (1998) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3β-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. Plant Cell 10: 2115-2126

Yamamoto R, Fujioka S, Demura T, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuda H (2001) Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. Plant Physiol 125: 556-563

Yamamoto R, Fujioka S, Iwamoto K, Demura T, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuda H (2007) Co-regulation of brassinosteroid biosynthesis-related genes during xylem cell differentiation. Plant Cell Physiol 48: 74-83

Yang GX, Jan A, Shen SH, Yazaki J, Ishikawa M, Shimatani Z, Kishimoto N, Kikuchi S, Matsumoto H, Komatsu S (2004) Microarray analysis of brassinosteroids- and gibberellin-regulated gene expression in rice seedlings. Mol Genet Genomics 271: 468-478

Yang MT, Chen SL, Lin CY, Chen YM (2005) Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings. Planta 221: 374-385

Yang XH, Xu ZH, Xue HW (2005) Arabidopsis Membrane Steroid-Binding Protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. Plant Cell 17: 116-131

Yin Y, Wang ZH, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. Cell 109: 181-191

Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. Cell 120: 249-259

Yokota T (1997) Structures, biosynthesis and functions of brassinosteroids. Trends Plant Sci 2: 137-142

Yokota T, Arima M, Takahashi N (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant hormone potency from chestnut insect gall. Tetrahedron Lett 23: 1275-1278

Yokota T, Sato T, Takeuchi Y, Nomura T, Uno K, Watanabe T, Takatsuto S (2001) Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-norcastasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone. Phytochemistry 58: 233-238

Young MW, Kay SA (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. Nat Rev Genet 2: 702-715

Zhang S, Cai Z, Wang X (2009) The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. Proc Natl Acad Sci USA 106: 4543-4548

Zhao J, Peng P, Schmitz RJ, Decker AD, Tax FE, Li J (2002) Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. Plant Physiol 130: 1221-1229

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol 136: 2621-2632

Zurek DM, Clouse SD (1994) Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. Plant Physiol 104: 161-170

# 8. FÜGGELÉK

## 8.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# 8.2. A disszertáció anyagához kapcsolódó összefoglaló jellegű publikációk

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

Szekeres M (2003) Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. Trends Plant Sci 8: 102-104

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

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