

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológia Tanszék

37. OTDK

**Az UVR8 fotoreceptor foszforilációjának élettani hatásai *Arabidopsis thaliana*
csíranövényben**

Sípos Lilla

Biológus MSc.

Növénybiológia specializáció

Témavezető: Dr. Viczián András, tudományos főmunkatárs, HUN-REN Szegedi Biológiai
Kutatóközpont

Belső konzulens: Dr. Szepesi Ágnes, egyetemi adjunktus, Szegedi Tudományegyetem TTIK,
Növénybiológia Tanszék

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Bevezetés	3
2.1. Fotoreceptorok a növényekben	3
2.2. Az UV-B sugárzás és az UV-B fotoreceptor azonosítása	3
2.3. UVR8 receptor	4
2.3.1. UVR8 receptor szerkezete és működése	4
2.3.2. UVR8 receptor által irányított jelátvitel.....	5
2.3.3. UVR8 receptor foszforilációja	7
3. Előzetes eredményeink.....	8
4. Célkitűzések	9
5. Anyagok és módszerek.....	10
5.1. A vizsgált növényvonalak.....	10
5.2. Csíranövények nevelése western-blot analízishez	10
5.3. A csíranövények hipokotilhosszának mérése	11
5.4. Növények nevelése és kezelése „szemi-natív” western blot analízishez.....	12
5.5. Mintaszedés.....	12
5.6. Denaturált fehérjekivonat készítése csíranövényből.....	12
5.7. Fehérjeszint meghatározás amidofekete oldattal.....	13
5.8. Western blot analízis	13
5.9. „Szemi-natív” western blot.....	15
6. Eredmények	18
7. Az eredmények értékelése	26
9. Irodalomjegyzék	29
10. Köszönetnyilvánítás	32

1. Rövidítések jegyzéke

<u>A</u> rabidopsis <u>M</u> edium	AM
<u>C</u> HALCONE <u>S</u> YNTHASE	CHS
<u>C</u> ONSTITUTIVELY <u>P</u> HOTOMORPHOGENIC <u>1</u>	COP1
<u>D</u> ithio <u>t</u> reitol	DTT
ELONGATED <u>H</u> YPOCOTYL <u>5</u>	HY5
<u>H</u> Y5 <u>H</u> OMOLOG	HYH
<u>R</u> EPRESSOR OF <u>U</u> V-B <u>P</u> HOTOMORPHOGENESIS	RUP
<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate	SDS
<u>U</u> V <u>R</u> ESISTANCE LOCUS <u>8</u>	UVR8

2. Bevezetés

2.1. Fotoreceptorok a növényekben

A növények helytűlő életmódjukból adódóan folyamatosan kitettek a különböző környezeti hatásoknak, amelyhez folyamatosan alkalmazkodniuk kell a túlélés érdekében. Az egyik ilyen környezeti hatás a fény. A napfény energiát biztosít a fotoszintézishez, és kulcsfontosságú információkat szolgáltat a környezetről a növények számára, ugyanakkor környezeti stresszt is jelenthet. A fény fotonok formájában éri el a növényeket, amelyek hatással vannak a növények anyagcseréjére, fejlődésére az életciklus teljes időtartama alatt. A Napból érkező fénysugarak széles hullámhossz-tartományt ölelnek fel, ezek érzékelésében pedig több fényt érzékelő fehérjemolekula (fotoreceptor) játszik szerepet. Mindegyik fotoreceptor egy adott hullámhosszú sugárzást érzékel, melynek hatására biológiailag aktív térszerkezetet vesz fel és specifikus jelátviteli folyamatokat vezérel (Sullivan & Deng, 2003). A fotoreceptorok által közvetített jelátvitel biztosítja a növények számára a megfelelő válaszreakciók kialakítását a fényviszonyoktól függően, reagálva a fény minőségi és mennyiségi tulajdonságaira. Így alakítja ki a fény azoknak az alaktani változásoknak az összességét, amiket fotomorfogenezisnek nevezünk. A virágos növényekben az alábbi fotoreceptorokat azonosították: a vörös/távoli vörös fényt érzékelő fitokrómok; a kék és ultraibolya-A (UV-A) fényt érzékelő kriptokrómok, fototropinok és Zeitlupe receptorcsalád tagjai (Galvão & Fankhauser, 2015); valamint az UV-B sugárzást érzékelő UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) fotoreceptor (Rizzini és mtsai., 2011). Ezek segítségével képesek a növények életműködéseiket az őket körülvevő fényviszonyokhoz igazítani és túlélésüket biztosítani.

2.2. Az UV-B sugárzás és az UV-B fotoreceptor azonosítása

Az UV sugárzás hagyományosan az alábbi hullámhossz-tartományokra osztjuk fel: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) és UV-C (100-280 nm). A Föld felszínére érkező napfény tartalmaz UV-A-t és az UV-B-t; azonban az UV-C és az UV-B sugárzás a 290 nm alatti tartományának a földfelszínre jutását a sztratoszférikus ózonréteg megakadályozza (Paul & Gwynn-Jones, 2003). Az UV-B a bioszférában dinamikusan és folytonosan változik, nagymértékben függve olyan nagy léptékű változóktól, mint az ózonréteg vastagsága, a napsugarak beesési szöge (földrajzi szélesség, évszak, napszak), tengerszint feletti magasság, troposzférikus szennyeződés, felhőborítás, valamint olyan kis léptékű változóktól, mint a

sugárzás felszíni visszaverődése és az árnyékolás. Az UV-B csak kis része a globális besugárzásnak, kevesebb mint 0,1% a földfelszínen (Aphalo, 2017). Ennek ellenére a rövid hullámhosszú, nagy energiájú UV-B fotonok biológiai hatásai jelentősek, mert számos az életműködések számára nélkülözhetetlen molekula, beleértve a DNS-t, fehérjéket, lipideket, elnyelik, így rájuk az UV-B sugárzás káros hatást gyakorol. Az UV-B így potenciális abiotikus stressz faktorként hat bármely napfénynek kitett szervezet, különösen a helyhez kötött, fotoszintetizáló növények számára (Frohnmeier & Staiger, 2003).

Az 1970-es években végzett kutatások kimutatták, hogy az UV-B alacsony dózisa fotomorfogenikus válaszokat váltanak ki a növényekben, amelyek magukban foglalják a hipokotil megnyúlás gátlását, a sziklevelek növekedésének elősegítését és a flavonoid bioszintézis stimulálását (Wellmann, 1976). Mivel ezek az élettani folyamatok nem társultak az UV-B nem specifikus roncsoló hatásával, gyanítható volt, hogy egy UV-B specifikus fotoreceptor létezése, melynek azonosításában viszont több évtizeden át kevés előrelépés történt. 2002-ben Kliebenstein és munkatársai azonosították az *uv resistance locus 8* Arabidopsis mutánst, amiben UV-B specifikus válaszok sérültek (Kliebenstein és mtsai., 2002). Később Rizzini és munkatársai igazolták, hogy az UVR8 egy UV-B specifikus növényi fotoreceptor (Rizzini és mtsai., 2011).

A növények UV-B akklimációja, amelyben a UVR8 fotoreceptor-jelátviteli út vonal kulcsfontosságú szerepet játszik, elengedhetetlen az UV-B tolerancia eléréséhez. Általánosságban az UV-B expozíció számos növényi anyagcsere folyamatot, fejlődést és morfológiát szabályoz a sokféle gén különböző kifejeződése révén. Tekintettel az UV-B növényekre gyakorolt hatására, kulcsfontosságú megérteni az UV-B érzékelés és jelátvitel mechanizmusait, valamint ezek együttműködését más jelátviteli utakkal.

2.3. UVR8 receptor

2.3.1. UVR8 receptor szerkezete és működése

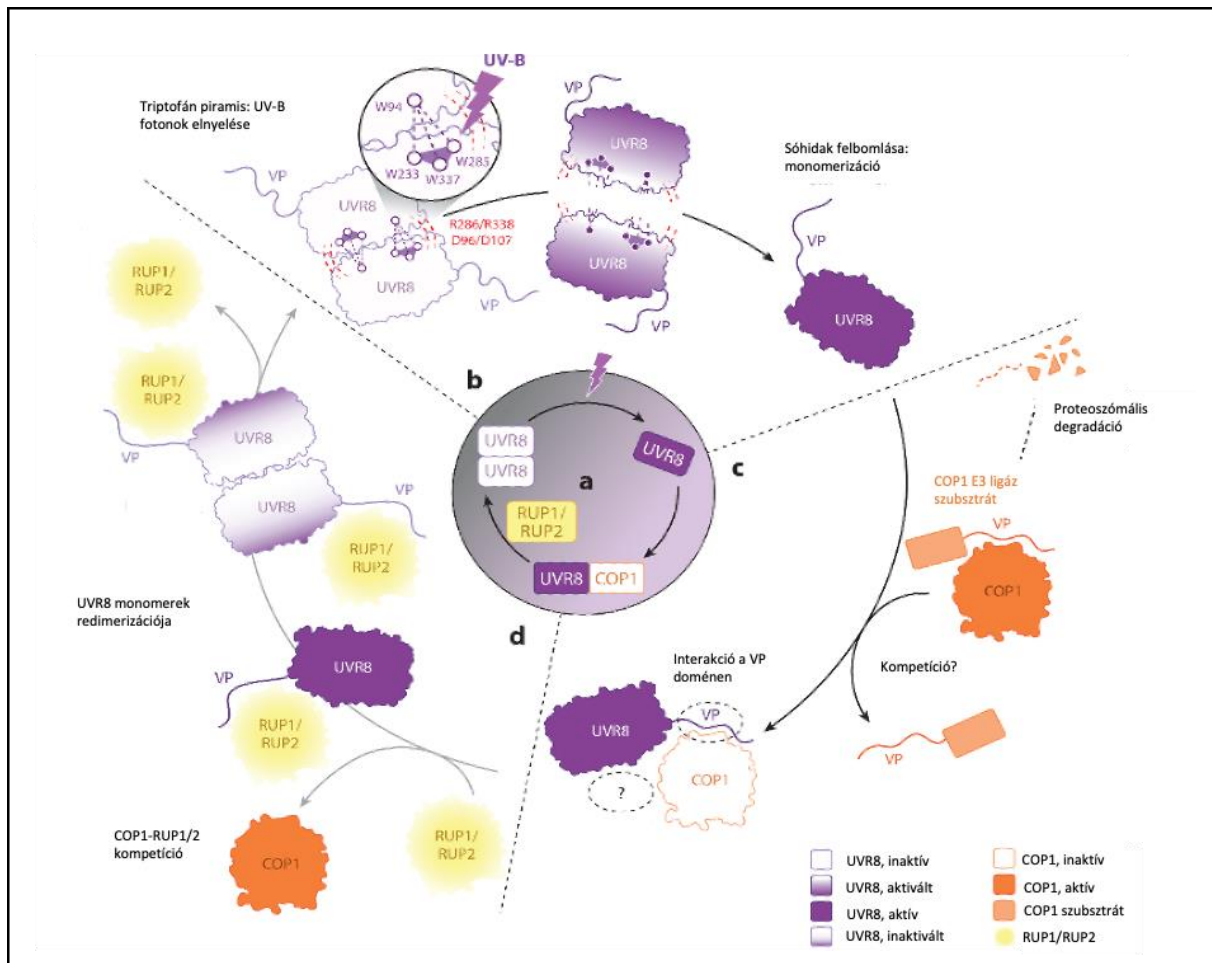
Az UVR8 fotoreceptor molekuláris szerkezetének megismerése fontos a növények UV-B sugárzásra adott válaszána megértésében. Az UVR8 inaktív állapotban egy homodimer fehérje, melyben a két azonos fehérje-alkotórészt diszulfid hidak kapcsolnak egymáshoz. UV-B sugárzás hatására a dimerek szétesnek, és felszabaduló UVR8 monomerek, melyek a fotoreceptor aktív formái, képesek a jelátviteli utak aktiválására (1. ábra).

A monomerek fánk alakúak, melyek központi része 7 darab β -propellerből áll. A „fánk” közepén található kiemelt helyzetű arginin és aszparaginsav aminosavak sóhidakat képeznek egymással, amelyek összetartják a monomereket. Más növényi fotoreceptorokkal ellentétben az UVR8-nak nincs szüksége külső kromoforra; a fehérje triptofán (W) aminosavainak UV-B-elnyelő tulajdonsága biztosítja a kromofór funkciót. Az UVR8 14 W aminosavval rendelkezik, közülük a W233, W285 és W337, amelyek egy úgynevezett triptofán „piramis”-t alkotnak és kapcsolódnak szemben lévő monomer W94-ével (Christie és mtsai., 2012). Miután a triptofánok elnyelték az UV-B fotonokat, a monomerek közti sóhidak felbomlanak és a biológiailag aktív monomerek felszabadulnak (1. ábra).

2.3.2. UVR8 receptor által irányított jelátvitel

Az inaktív UVR8 homodimer a növényi sejtek sejtplazmájában található. UV-B sugárzás hatására kialakuló monomerek a sejtmagban feldúsulnak, ahol több fehérjemolekulával lépnek kölcsönhatásba, ami az UVR8-függő jelátvitel fontos kezdeti lépése. Az UVR8 jelátviteli kaszkád egyik kulcsfontosságú kölcsönhatása az UVR8 és a CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), egy E3 ubiquitin ligáz között történik. UV-B sugárzás hatására kialakuló UVR8 monomerek a COP1-hez kötődnek, és gátolják annak ubiquitin ligáz aktivitását (Favory és mtsai., 2009). Ez a kölcsönhatás megakadályozza olyan fehérjekomponensek lebontását, melyek az UV-B által kiváltott génexpressziós változások bekövetkezéséhez szükségesek (1. ábra).

Ilyen transzkripciósfaktor az ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) és homológja, a HY5 HOMOLOG (HYH). Ezeket a COP1 ubiquitinálja, de amikor az UVR8-COP1 kapcsolat létrejön, a HY5 és a HYH felhalmozódása bekövetkezik a sejtmagban. Ez az UVR8 által közvetített UV-B specifikus jelátvitel egyik fontos lépése. A megemelkedett szintű HY5 és HYH serkenti az UV-védelemben és akklimációban részt vevő gének expresszióját (Binkert és mtsai., 2014). Ezek közül kiemelkedik a CHALCONE SYNTHASE (CHS) enzim, amely a flavonoidok bioszintézisében vesz részt, amely a növények UV-védelmének kulcsfontosságú összetevője (1. ábra).



1.ábra: Az UVR8 fotociklus mechanizmusa. (a) Az UVR8 fotociklus sematikus ábrája. UV-B elnyelés hatására az UVR8 dimerek felbomlanak és az aktív monomerek a COP1-hez kapcsolódva irányítják a jelátvitelt. Az UVR8 a RUP fehérjék segítségével dimerizálódik, inaktív állapotba kerülve. (b) Az UVR8 homodimert (inaktív, fehér) sóhid kölcsönhatások kötik össze, ezek UV-B hatására felbomlanak (lila monomerek), miután a triptofán piramis (kinagyításban bekarikázva) UV-B fotonokat gyűjtött be. (c) Az UVR8 C-terminálisának VP doménjéhez hozzákötődik a COP1. Ezáltal a COP1 szubsztrátok ubikvitinálása és proteasómális lebontása megszűnik, így azok mennyisége megnő és hozzájárulnak a fotomorfogenezishez. (d) A RUP1 és a RUP2 kölcsönhatásba lép az UVR8 VP-motívumával, feltehetően a COP1-hez hasonló módon, leszorítva ezzel a COP1-et az UVR8-ról. A RUP1 és RUP2 felelős az UVR8 dimerizálódásáért, melynek molekuláris részletei nem ismertek (eredeti ábra: Podolec és mtsai., 2021)

Kiderült az is, hogy nem csak a COP1, hanem a REPRESSOR OF UV-B PHOTOMORPHOGENESIS 1 (RUP1) és a RUP2, a WD40 domént tartalmazó fehérjék is közvetlen kölcsönhatásba lépnek az UVR8 monomerekkel (Gruber és mtsai., 2010; Heijde & Ulm, 2013). Érdekes, hogy mind a COP1, mind a RUP2 az UVR8 C terminális részén található úgynevezett VP motívumához kötődik és valószínűleg „versengenek” a kötőhelyért (Lau és mtsai., 2019). Míg a COP1 nem engedi az UVR8 monomerek dimerizálódását, ezáltal aktív állapotban tartja őket, a RUP1 és RUP2 fehérjék, feltehetően kompetitíven kiszorítják a COP1-et az UVR8 VP motívum kötéséből, ezáltal a monomerek újra dimerizálódhatnak. Ezáltal a RUP fehérjék csökkentik az aktív monomerek mennyiségét, így az UVR8 jelátvitel negatív szabályozói (1. ábra) (Yin és mtsai., 2015; Podolec és mtsai., 2021).

2.3.3. UVR8 receptor foszforilációja

Dolgozatom elkészítése közben jelent egy közlemény, amely az UVR8 foszforilációjáról számol be (W. Liu és mtsai., 2024). A szerzők megmutatták, hogy az UVR8 a jelátvitelben fontos szerepet játszó C-terminális részén levő 402-es helyzetű szerin aminosava (S402) az UV-B expozíciót követően foszforilálódik. Az S402 foszforilációja elősegíti az UVR8 válaszok közvetítésében részt vevő specifikus fehérjék felhalmozódását (HY5, CHS). Következésképpen a megváltozott fehérje felhalmozódás fokozza az UV-B sugárzásra adott kulcsfontosságú metabolikus választ, a flavonoidok és a hidroxifahéjsavak bioszintézisét. A jelen kutatások azt mutatták, hogy az S402 foszforilációja (1) erősíti az UVR8-RUP kölcsönhatást, (2) de nem változtatja a monomerek dimerizációját (3) és nem befolyásolja az UVR8-COP1 kölcsönhatást. A jövőben meg kell határozni, hogy az S402 foszforilációja befolyásolja-e más interaktorok kötődését és további kutatásokra van azonban szükség a monomerképződés, a nukleáris felhalmozódás és az S402 foszforilációja közötti kinetikai kapcsolat meghatározására. Azt a kérdést is nyitva hagyták a szerzők, hogy más aminosavak esetleges foszforilációja hogyan befolyásolja az UVR8 működését.

3. Előzetes eredményeink

Csoportunk *in vivo* tömegspektrométeres vizsgálatok segítségével korábban már azonosította az UVR8 molekula olyan aminosavait, melyek foszforilálódnak és meghatározta ezek pozícióját (402, 420 és 421-es szerin aminosavak). Később ennek ismeretében állítottak elő olyan UVR8 változatokat, amelyekben ezeket a szerineket nem foszforilálódó (alanin, A), valamint olyanokat is, amelyekben foszforilációt utánzó (aszparaginsav, D) aminosavak helyettesítik. Ezeket az YFP (yellow fluorescent protein) molekulával összekapcsolva fejezték ki az *Arabidopsis thaliana* modellnövény *uvr8-6* mutánsában, mely endogén UVR8 molekulát nem tartalmaz. Ezeknek a transzgénikus növényeknek a részletes leírását az Anyagok és módszerek, 1. fejezete tartalmazza.

Csoportunk korábbi vizsgálatai során kiderült, hogy élesztő kéthibrid rendszerben, az UVR8 foszforilációt utánzó változatához a RUP2 erősebben kötődik, mint a nem foszforilálódó verzióhoz. Ezzel szemben a COP1 esetében nem tapasztaltunk ilyen eltérést.

4. Célkitűzések

Az UVR8 jelátvitelének finomszabályozása még nem ismert, ennek egy lehetséges módja lehet az UVR8 poszttranszlációs módosítása. Ez akár kulcsfontosságú lehet annak megértéséhez, hogy a növények hogyan reagálnak az UV-sugárzásra. Ezek a válaszok alátámasztják a természetes környezetben való alkalmazkodást és akklimatizációt, és erősítik a túléléshez szükséges tulajdonságokat a különböző növényekben.

Csoportunk előzetes eredményei alapján azt feltételezzük, hogy az UVR8 foszforilációja szabályozza a RUP2-höz történő kötődését, ezáltal a monomerek dimerizációján keresztül a rendelkezésre álló aktív UVR8 szintjét. Ez hatással lehet az UVR8 jelátvitelére és a növények fotomorfogenikus fejlődésére is.

Az alábbiakat tűztük ki céljainknak:

- Megvizsgáljuk, hogy az UVR8 molekula foszforilálódó szerin aminosavainak kicserélése eredményez-e bármilyen funkcionális változást a vad típushoz képest?
- Milyen fotomorfogenikus választ képesek kiváltani a különböző foszforilációs állapotokat jelképező mutáns UVR8 változatok?
- Megváltoztatja-e a foszforiláció az UVR8 dimerizálódásának dinamikáját?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A vizsgált növényvonalak

Vizsgálatainkhoz az *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 ökotípusát és az *uvr8-6* funkcióvesztéses UVR8 mutánst használtuk (ugyanebben az ökotípusban). Az *uvr8-6* mutánsban az UVR8 promóter irányítása alatt fejeztük ki az YFP molekulával összekapcsolt UVR8 fehérjét (*UVR8:YFP-UVR8* transzgén) (Bernula és mtsai., 2017). Ennek mintájára készítette el a csoportunk *uvr8-6* háttérben, a 402, 420 és 421-es szerin aminosavak helyett a nem foszforilálódó alanin helyettesítéseket tartalmazó YFP-UVR8(3xSA)-t (*UVR8:YFP-UVR8(S402-420-421A)* transzgén), illetve a foszforilációt utánzó aszparaginsav helyettesítéseket tartalmazó YFP-UVR8(3xSD)-t (*UVR8:YFP-UVR8(S402-420-421D)* transzgén) kifejező növényeket. Ezek a növényvonalak a munka megkezdésekor rendelkezésre álltak.

5.2. Csíranövények nevelése western-blot analízishez

A növényeket steril körülmények közt neveltem. Legelőször a magokat 30%-os Domestos oldatba áztattam be. Steril fülkében dolgozva 15 perc leteltével steril pipettahegy segítségével eltávolítottam a Domestos oldatot, majd steril vízzel 3-4-szer átmostam a magokat. Ezután a mosást elvégeztem steril pipettahegy segítségével a magokat szintén steril AM táptalajra szélesztettem.

A táptalajra szélesztett magokat egy fekete kartondobozban fekete kendővel letakartam, 4 °C-on sötétben tároltam 4 napig. Ezután növénynevelő szobában 8 h fehér fény / 16 h sötét fényciklusokon neveltem 7 napig, a mintavételig.

AM táptalaj:

2,15 g/L MS por (Sigma-Aldrich),

1% (w/v) szacharóz (Molar, Halásztelek, Magyarország),

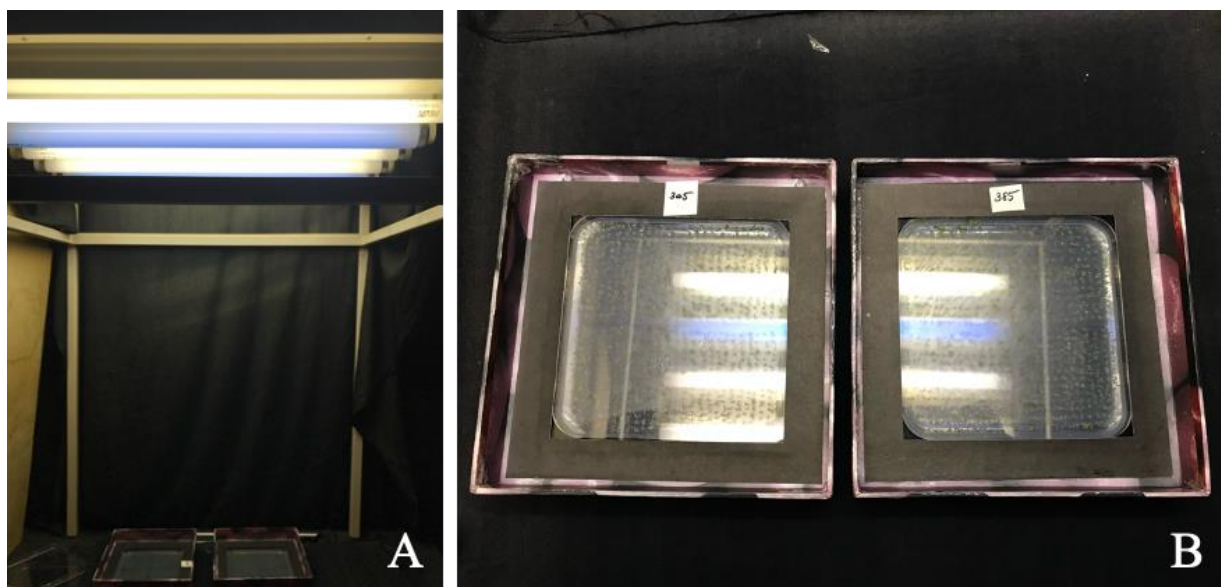
0,2% (w/v) phytigel (Sigma-Aldrich)

pH=5,6-5,8; beállítás 1 M-os KOH oldattal

5.3. A csíranövények hipokotilhosszának mérése

Miután a sterilizált magokat steril AM táptalajra szélesztettük, valamint 4 napig sötétben 4 °C-on, majd 3 napig növénynevelő kamrában (MLR-351H, Sanyo, Oszaka, Japán) neveltük rövidnappalos körülmények között (8 óra fény/16 óra sötét) fehér fényben ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 22 °C-on. Ezután 4 napig UV-B sugárzással ($1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kevert fehér fényvel ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), kezeltük 22 °C-on (2A ábra). Fehér fluoreszcens fénycsöveket (L18W, Osram, München, Németország) és UV-B fénycsöveket használtuk (TL20W/01RS, Philips, Amszterdam, Hollandia) (Bernula és mtsai., 2017).

Az UV-B kezeléshez 3 mm vastag WG szűrőket használtunk (Schott, Mainz, Németország). Ezek a szűrők úgynevezett alulvágó (cut-off) filterek. Az UV-B kezelt növényeket (+UV-B) WG305 (kiszűri az UV-C tartományt, de átengedi az UV-B nagy részét), a kontrollt pedig (-UB-V) WG385 (kiszűri a teljes UV-B tartományt, de a fehér fényt átengedi) filterrel fedtük be (2B ábra).



2. ábra: Csíranövények nevelése hipokotilhossz vizsgálathoz

(A) A csíranövényeket UV-B és fehér fény keveréke alatt neveltük a hipokotilhossz méréséig. A mintákat egy vastag, fekete szövettel letakart fülkében világítottuk meg, így csak a fehér fény és UV-B sugarak hatását tudtuk vizsgálni. Az állandó hőmérsékletet klímaberendezés biztosította ($22 \pm 0,5$ °C).

(B) A növényeket WG szűrőkkel takartuk le: a WG305 kiszűri az UV-C tartományt, de átengedi az UV-B nagy részét, a WG385 pedig kiszűri a teljes UV-B tartományt, de a fehér fényt átengedi. Így egyidejűleg tudtunk UV-B-vel kezelt, illetve kezeletlen növényeket nevelni,

A 4. napon egy MS és szacharóz mentes agaróz lemezre sorba tettük a csíranövényeket, elfektetve, hogy látható legyen a hipokotil. Az így sorbarendezt csíranövényeket beszkeneltük és az ingyenesen elérhető ImageJ (Wisconsin, USA) szoftver segítségével (Schneider és mtsai., 2012) lemértük a hipokotilok hosszukat. A kapott eredményeket Microsoft Excel (Redmond, USA) segítségével értékeltük ki.

5.4. Növények nevelése és kezelése „szemi-natív” western blot analízishez

A sterilizált magokat MS3 táptalajra szélesztettük és 4 napig sötétben és 4 °C-on, majd fehér fényen egy hétig neveltük. Mintaszedés előtt 30 perces (broadband) UV-B kezelést is kaptak a növények (ULTRAVIOLET_B TL 40W/12RS, Philips). Az UV-B kezelés után, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fehér fényen regeneráltuk a növényeket, eközben 20, 40, 60, 120, 180 perc regenerációs idő után minden alkalommal mintát szedtünk.

MS3 táptalaj:

4,3 g/l Murashige-Skoog Medium por (Sigma-Aldrich),

3% (w/v) szacharóz (Molar),

1% (w/v) Difco™ agar (Fisher Scientific),

pH=5,6-5,8; beállítás 1 M-os KOH oldattal

5.5. Mintaszedés

Minden egyes mintát (0,1 g) sterilizált, 5 mm átmérőjű, üveggolyóval ellátott biztonsági záras 2 ml-s mikrocentrifuga csőbe szedtem, majd folyékony nitrogénbe helyeztem. A mintaszedés után a növényi anyagot -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

5.6. Denaturált fehérjekivonat készítése csíranövényből

A fagyott csíranövényeket 5 mm-es üveggolyóval ráztuk 2 percig 30 1/s fordulatszámon (Retsch MM 301. Haan, Németország), majd hozzáadtuk a denaturáló protein feltáró puffert. 0,1 g mintához 250 μl feltáró puffert adunk. 95 °C-on 2 percig inkubáltuk a mintákat, majd újabb 2 percig ráztuk. Ezután 20 percig centrifugáljuk a kivonatokat (17000 g). A felülúszót egy új mikrocentrifuga csőbe helyeztük és ezt használtuk a továbbiakban.

Feltárási puffer összetétele:

- 50 mM Tris-HCl (Molar Chemicals) (pH=6,8)
- 4 M urea (Sigma-Aldrich)
- 3% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Molar Chemicals)
- 0,1 M ditiotritol (DTT) (Sigma-Aldrich)
- 10% glicerol (Sigma-Aldrich)
- 0,4 g/L brómfenolkék (Serva, Heidelberg, Németország)

5.7. Fehérjeszint meghatározás amidofekete oldattal

20 µl mintát és 180 µl vizet, valamint 800 µl amidofekete csapadékképző oldatot egy Eppendorf csőben összekeverünk, ezután pedig 20 percig centrifugáltuk (13300 g). A csapadékhoz hozzáadunk 1 ml amidofekete mosó oldatot, majd 10 percig centrifugáljuk. Ezután a felülúszót kiöntjük és a csapadékot megszáritjuk, majd 1 ml 0,2 M-os NaOH oldatban feloldjuk és 1 ml-s küvetákba helyezzük. 596 nm-en spektrofotométer segítségével meghatároztuk az OD-t, ami segítségével már kiszámoltuk a mintáink fehérje koncentrációját.

amidofekete csapadékképző oldat:

- 10% (v/v) ecetsav
- 90% (v/v) metanol
- 0,5 g/l amidofekete kristály

amidofekete mosó oldat:

- 10% (v/v) ecetsav
- 90% (v/v) metanol

5.8. Western blot analízis

A fehérje minták futtatásához denaturáló akrilamid gélt öntöttem, melynek összetételét az 1. táblázat mutatja. Az akrilamid gél minden zsebébe 10 µl össz-fehérje kivonatot töltöttem. Az elektroforézist futtatópufferben végeztem 80 V-on 15 percig, majd 120 V-on 1,5 óráig (, PowerPac HC, BioRad, Hercules, USA). A gél futtatása után metanollal 2 percig aktiváltam az Immobilon® -P PVDF (polivinilidén-difluorid) membránt (Merck Millipore, Darmstadt, Németország), amire a fehérjéket átvittem 100 V-on 2 óra hosszáig, 4 °C-on blotting pufferben.

Miután a fehérjék a PVDF membránra kerültek, azután a membránokat mosópufferben áztatjuk egy pár másodpercig, majd a mosópufferből és sovány tejporból és TBST pufferből készült 5%-os (w/v) oldatban inkubáltuk őket folyamatos mozgatás mellett, 4 °C-on, 16 órán keresztül. Ezután a tejporthat mosópufferrel kimostam (10 perc egyenletes billegtetés), 2 órán keresztül elsődleges ellenanyaggal, mosópufferben (1:2000 hígított anti-UVR8 ellenanyaggal (Agrisera, Vännäs, Svédország)) hibridizáltam szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránokat mosópufferrel mostam 5x5 percig, majd a másodlagos ellenanyaggal 1,5 óráig, szobahőmérsékleten hibridizáltam (HRP kapcsolt nyúl-IgG elleni (Dako, Carpinteria, USA)), majd az előhívás előtt szintén 5x5 perc mosás következett. A mosás után a membránról a mosópuffert papírtörölközővel leittattam és Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Peroxidáz és Luminol reagensek 1:1 arányú oldatában 1 percig szobahőn inkubáltam. IBright FL1500 képalkotó rendszer (Thermo-Fisher, Waltham, USA) segítségével detektáltam a kemilumineszcens jeleket.

Az anti-UVR8 ellenanyagon kívül még anti- aktin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ellenanyaggal is hibridizáltam a membránokat (1:10000 hígított anti- aktin ellenanyaggal (1,5 óra hosszáig, szobahőmérsékleten, majd 5x5 percig mosó pufferben mostam. Ezután a másodlagos antitesttel (HRP kapcsolt egér-IgG elleni (Invitrogen, Waltham, USA) hibridizáltam, szintén 1,5 óráig, szobahőmérsékleten, majd ezt is 5x5 perces mosás követte az előhívás előtt.

1. táblázat: A western-blot analízis során felhasznált akrilamid gélek összetétele

Gyűjtő gél (1 ml)	Futtató gél 10% (5 ml)
680 µl tisztított víz	2 ml tisztított víz
170 µl 30%-os akrilamid mix (Sigma-Aldrich)	1,7 ml 30%-os akrilamid mix
130 µl 1 M Tris oldat (pH 6,8)	1,3 ml 1,5 M Tris oldat (pH 8,8)
10 µl SDS (10% (v/v))	50 µl SDS (10% (v/v))
10 µl APS (10% (v/v))	50 µl APS (10% (v/v))
1 µl TEMED	2 µl TEMED

Futtatópuffer összetétele:

- 25 mM Tris (Molar Chemicals)
 - 192 mM glicin (Sigma-Aldrich)
 - 0,1% (w/v) SDS (Molar Chemicals)
- (pH= 8,3)

Blottoló puffer: (1 l-es végtérfogathoz):

- 3,03 g Tris
- 14,4 g glicin
- 1,5 ml 10% (v/v) SDS oldat
- 200 ml etanol

Mosó puffer/TBST oldat (1 l-es végtérfogathoz):

- 6,06 g Tris
 - 11,69 g NaCl
 - 0,5 ml TWEEN (Sigma Aldrich)
- (pH= 7,4) (HCl-al állítottuk be)

5.9. „Szemi-natív” western blot

A fentiekhez, vagyis a denaturáló western-blot analízishez hasonló technikát alkalmaztam ebben az esetben is, viszont annyi különbséggel, hogy a mintáinkat nem denaturáló környezetben tártam fel, valamint futtatásig végig jégen tartottam. Erre a módszerre azért volt szükség, hogy ne csak az UVR8 monomereket, hanem a dimereket is megfigyelhessük. 2 perc üveggolyóval töltött Eppendorf-csőben történő rázatás után (30 1/s fordulatszám) a feltáró pufferből 200 µl-t pipettáztunk minden egyes mintához, majd újabb 2 percig ráztattuk. Ezután 4 °C-on, 20 percig centrifugáltuk a mintánkat (13000 g) és a felülúszót új mikrocentrifuga csőbe gyűjtöttük. 64 µl fehérjekivonathoz 16 µl hideg „loading” pufferhez adunk, ezeket jégen tároljuk a gél feltöltéséig. A gél zsebeibe egyenlő mennyiségű (15 µl) fehérje kivonatot töltöttünk. A futtatást 60 V-on 3,5 óra hosszáig végeztük. A futtatást követően a géleket blottoló pufferrel átitatott Wattman papírra helyeztem. Az így elrendezett géleket 30 percig erős UV sugárzással kezeltem (Philips, ULTRAVIOLET-B TL 40W/12RS). Erre azért van szükség, hogy a gélben lévő UVR8 dimerek monomerekké essenek szét, amit az anti-UVR8 ellenanyag fel tud ismerni. Az így kezelt gélekről vittem át a fehérjéket a PVDF membránra,

30 V-on, 4 °C-on, 16 órán keresztül (10. fejezet). A kemilumineszcens jeleket az IBright képalkotó rendszer (Thermo-Fisher) segítségével detektáltam és az ImageJ szoftver (Schneider és mtsai., 2012) segítségével értékeltem ki.

Nem denaturáló feltáró puffer (10 ml-hez):

- 500 µl 3M NaCl oldat
- 40 µl 0.5M EDTA (pH 8.0) oldat
- 100 µl Igepal, 500 µl 1M Tris (pH 7.6) oldat
- 20 µl 10mM ALLAN stock
- 20 µl 10mM MG132 stock,
- 8,82 ml tisztított víz
- 1db Sigma Coctail tabletta

„Loading” puffer (10 ml-hez):

- 2,5 ml 1M Tris oldat
- 2,87 ml 87%-os glicerin
- 0,77 g DTT
- 1 g SDS
- 0,05 g brómfenolkék
- tisztított víz, 10 ml-re feltöltve

5.10. RNS tisztítás qRT-PCR reakcióhoz

A folyékony nitrogénben lefagyasztott mintáinkat Retsch MM 101 homogenizátorral rázattuk 2 percig 30 1/s fordulatszámon, majd az így előkészített mintából tisztítottunk RNS-t a NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével a termék utasításai alapján. Ebből az oldatból 1 µg RNS-t használtunk cDNS készítésére, amit a RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kit-tel végeztük el (Fisher Scientific) a gyártó utasításait követve.

A kísérletek során 1-, 10-, 100-, és 1000-szeres hígítási sort készítettünk, majd ezek mRNS szintjét megállapítva a kapott értékekre egyenest állítottunk, majd ennek az egyenesnek a képletét alkalmazva a többi minta mRNS szintjét a TUB össz-mRNS szintjéhez vonatkoztatva számítottuk ki. A PCR reakciók összeállításához a POWER SYBR® Green PCR Master Mix

(Applied Biosystems, Waltham, USA) oldatot használtuk fel. Minden egyes reakcióhoz 5 µl SYBR® Green oldatot, 3 µl tisztított vizet, 1 µl primer mixet (2. táblázat, 3-3 µM), valamint 1 µl cDNS mintát tettünk. A PCR reakciót a BioRad CFX384™ Real-Time System gépben végeztem. Az általunk használt program az alábbi ciklusokból áll: 120 s 95 °C, ezután 40x ismételve az alábbi ciklust: 15 s 95 °C; 15 s 60 °C; 60 s 72 °C. A méréseket három biológiai ismétlésen és mindegyik biológiai ismétlésen 3 technikai ismétléssel végeztük el.

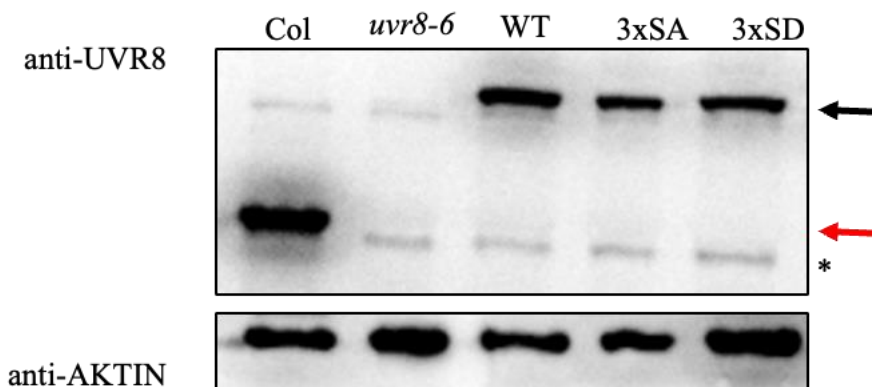
2. táblázat A PCR reakcióhoz szükséges forward és reverse primerek szekvenciái.

	forward	reverse
CHS	TGAGAACCATGTGCTTCAGGCGGAG	TGTCGACTTGTCGCACATGCGCT
TUB	CCAGCTTTGGTGATTTGAAC	CAAGCTTTCGGAGGTCAGAG

6. Eredmények

6.1. A transzgének kifejeződésének vizsgálata

A vizsgált szerin aminosavakat nem foszforilált és a foszforilációt utánzó aminosavakra cserélt UVR8 változatok funkcionális vizsgálatához olyan transzgénikus növényvonalakat választunk ki, melyek hasonló mennyiségben fejezték ki ezeket a fehérjéket. Ehhez western-blot analízist végeztünk az UVR8 felismerésére kifejlesztett anti-UVR8 ellenanyaggal (3. ábra). Vizsgálataink során a Col ökotípust, mint pozitív kontrollt használtuk fel, ugyanis ez a növény tartalmazta a természetben előforduló, endogén UVR8 molekulát. Negatív kontrollnak az *uvr8-6* mutánst használtuk, mely nem fejezi ki az UVR8 fehérjét. Látható, hogy az anti-UVR8 felismer egy 47 kDa-os sávot, de csak a Col csíranövényekben, míg az *uvr8-6* növényekben nem figyelhető meg specifikus festődés anti-UVR8 hatására. A 74 kDa-os YFP-UVR8 kimérafehérje expresszálódik mind vad típusú, mind pedig a 3xSA és 3xSD UVR8 mutációkat tartalmazó formában, melyeket egyformán felismer az anti-UVR8 antitest. A Col UVR8 fehérjeszintjéhez képest kevesebb YFP-UVR8 fejeződik ki a transzgénikus növényekben, az 3xSA-ban kevesebb fehérje volt, mint az 3xSD mutánsban. A vad típusú YFP-UVR8-at kifejező növény kevesebb UVR8 fehérjét tartalmaz, mint a Col, de többet, mint az 3xSA és 3xSD változatokat kifejezők. Az anti-AKTIN ellenanyaggal is hibridizáltunk a blotra, hogy ellenőrizzük, hogy minden minta azonos mennyiségű fehérjét tartalmaz.

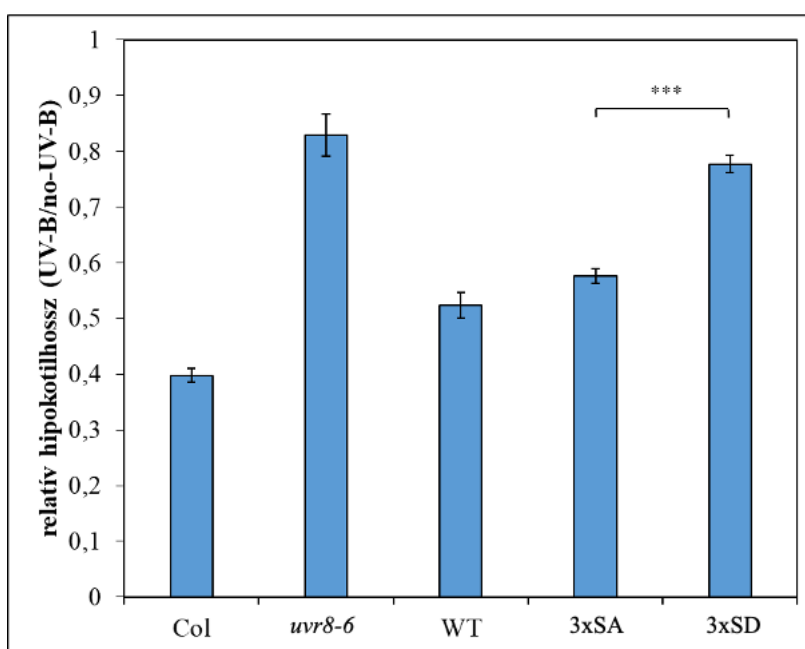


3. ábra. Az YFP-UVR8 kimérafehérjék kimutatása western blot hibridizációval.

7 napos csíranövényekből készített denaturált teljes fehérjekivonatokat vizsgáltunk western blot hibridizációval. Az anti-UVR8 antitest detektálja a 47 kDa-os endogén UVR8-at (piros nyíl) és a 74 kDa-os YFP-UVR8-at (fekete nyíl). A vizsgált növényvonalak: Col-0; *uvr8-6*; WT: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8*; 3xSA: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSA)*; 3xSD: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSD)*. A membránt újra hibridizáltuk anti-aktin ellenanyaggal, így ellenőrizve a membránra rögzített fehérjék mennyiségét. A csillag egy nem UVR8-specifikus sávot jelöl.

6.2. Az UVR8 foszforilációjának hatása a fotomorfogenezisre

A fotomorfogénikus fejlődés egyik jól jellemzett fenotipikus bélyege a hipokotilhossz növekedés fény általi gátlása. Minél aktívabbak a fény által vezérelt jelátviteli utak, ez annál hatékonyabb, azaz a hipokotil annál rövidebb. Az UV-B sugárzás is gátolja a hipokotil növekedését ezért csíranövényeket növesztettünk fehér fényen kevert UV-B megvilágítás alatt úgy, hogy 2 féle szűrővel takartuk le őket: az egyik átengedte az UV-B-t, a másik kiszűrte. Így meg tudtuk figyelni az UV-B hatását az UV-B nélkül növekedett növényekhez képest: az UV-B-vel megvilágított növények hipokotilhossz értékét elosztottuk az UV-B nélkül növekedett növények hipokotilhosszával (4. ábra).



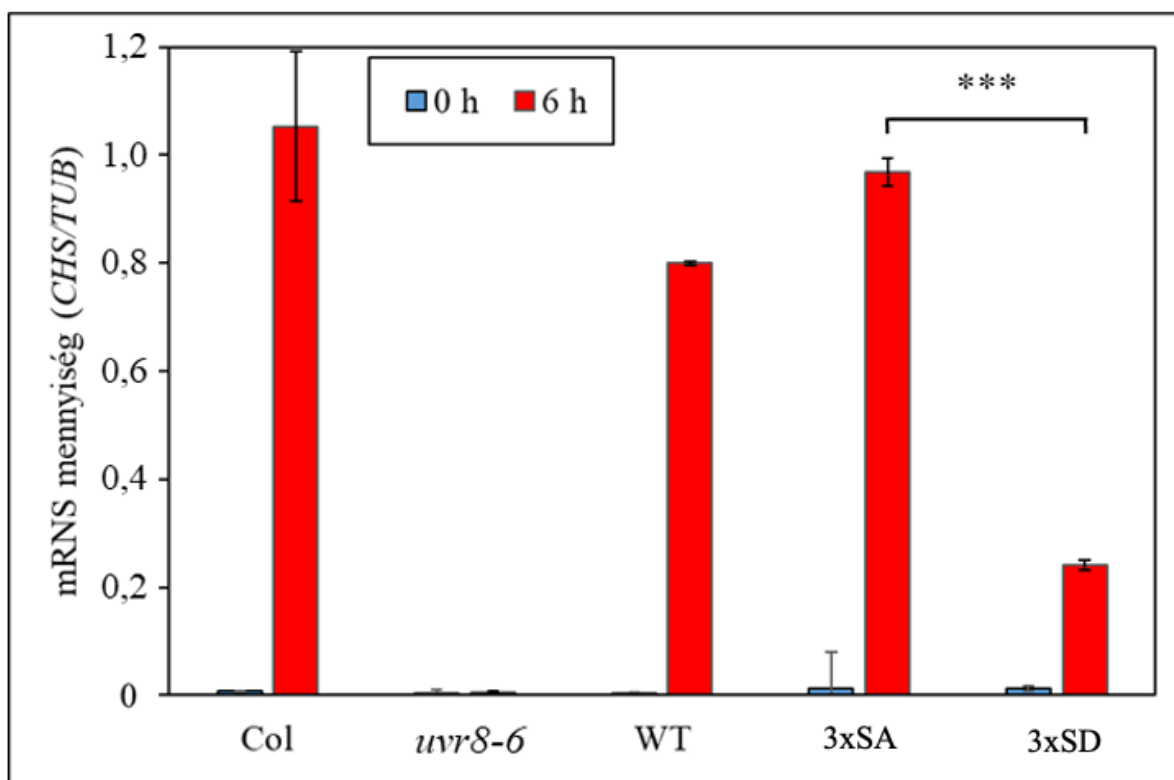
4. ábra. A foszforilációt utánozó UVR8 fotomorfogénikus válasza gyengébb, mint a nem foszforilált változaté.

A hét napos UV-B sugárzással kevert fehér fényen nevelt *Arabidopsis thaliana* csíranövények hipokotilhossza az UV-B nélkül nevelt növényekhez viszonyítva. A vizsgált növényvonalak: Col-0; *uvr8-6*; WT: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8*; *3xSA*: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSA)*; *3xSD*: *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSD)*. A hibaszávok a standard hibát jelölik. A statisztikai elemzést Student-féle t-próbával végeztük el, ez alapján a *3xSA* és *3xSD* mutánsok hipokotilhossza közt szignifikáns különbség van (***) $p < 0,001$).

A mérésekből arra következtethetünk, hogy a Col ökotípusban az UVR8 aktív fotoreceptor, ugyanis ennek a vonalnak volt a legrövidebb a hipokotilhossza, kb. 40%-ára rövidül UV-B hatására. Az *uvr8-6* mutáns esetében a leghosszabb a hipokotil, ez a fotomorfogenezis elmaradásával és az aktív UVR8 hiányával magyarázható. A vad típusú YFP-UVR8-at kifejező csíranövények rövidülnek UV-B hatására, nem olyan mértékben, mint a Col. Ez valószínűleg a kisebb fehérjeszinttel magyarázható és eredményünk jó egyezést mutat ezenek a vonalaknak a korábbi vizsgálatával (Bernula és mtsai., 2017). Az YFP-UVR8(3xSA) illetve az YFP-UVR8 kimérafehérjét kifejező növények hasonló hipokotilhosszt mutattak, míg az YFP-UVR8(3xSD) fehérjét tartalmazók hipokotilja hosszabb maradt.

6.3. Az UVR8 foszforilációjának hatása a *CHS* gén kifejeződésére

A CHS az antociánok, fényvédelmet biztosító pigment molekulák termelődését biztosítja. A CHS mRNS és fehérje szint emelkedése az UV-B kezelést követően a növény önvédelmi mechanizmusát jelzi. qRT-PCR technikával megmértük a *CHS* mRNS szintjét a mintáinkban UV-B kezelés előtt és után is. Referenciának a *TUB* (tubulin) szintjét használtuk, amely minden növényben közel azonos mennyiségű, ehhez viszonyítottuk a *CHS* szintjét. Eredményeink alapján jól látható, hogy a Col mintában megnövekedett a *CHS* mRNS mennyisége a kezelés hatására, azonban az *uvr8-6* mutánsban nem, ez azt mutatja, hogy a mutáns növény nem érzékeli az UV-B jelet. Az YFP-UVR8 és az YFP-UVR8(3xSA) fehérjéket kifejező növényekben hasonló mértékben emelkedett a kezelés után a *CHS* mRNS mennyisége, Az YFP-UVR8(3xSD) kimérafehérjét tartalmazó növényvonalban is megfigyeltünk a *CHS* szint emelkedését, de az jelentősen elmaradt az előzőektől (5. ábra).



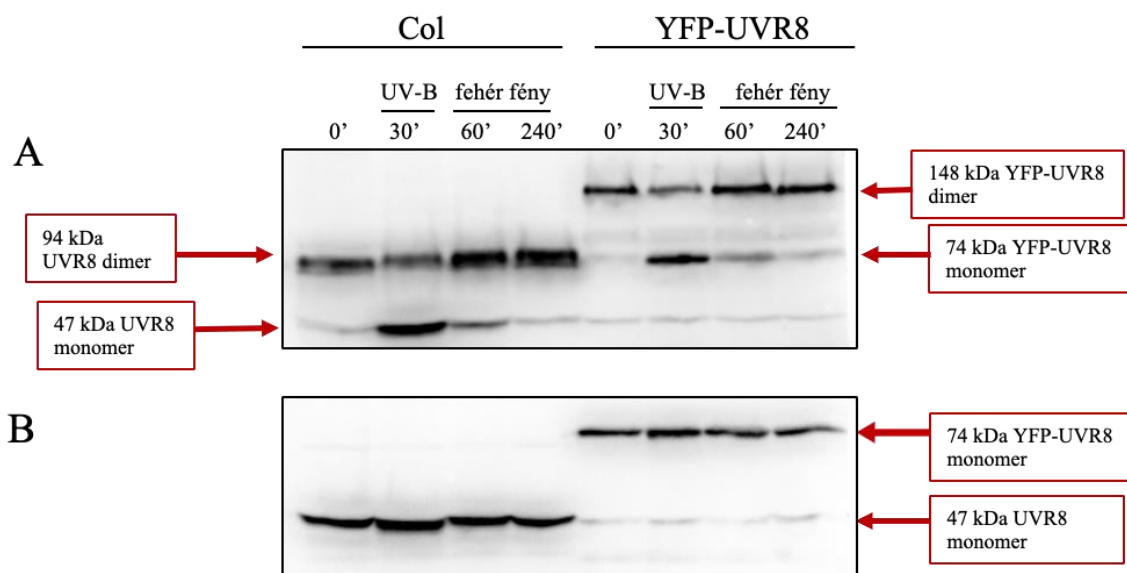
5. ábra. A *CHS* UV-B indukcióját az UVR8 foszforilációja gátolja.

qRT-PCR vizsgálat során mért relatív *CHS* mRNA mennyisége *TUB* mRNA-hez képest 6 órás UV-B kezelés előtt és után. Az kék oszlop (0 h) az UV-B kezelés előtt szedett minták mRNA mennyiségét jelöli, a piros oszlop (6 h) az UV-B kezelés után szedett minták mRNA mennyiségéről ad számunkra információt. A vizsgált növényvonalak: Col-0; *uvr8-6*; WT; *uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8*; *3xSA: uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSA)*; *3xSD: uvr8-6/UVR8:YFP-UVR8(3xSD)*. A hibasávok a standard hibát jelölik. A statisztikai elemzést Student-féle t-próbával végeztük el, ez alapján a *3xSA* és *3xSD* mutánsok hipokotilhossza közt szignifikáns különbség van (***) $p < 0,05$.

6.4. Az UVR8 monomerizációja és dimerizációja *in planta*

Ezzel a kísérlettel a volt a célunk, hogy laboratóriumunkba bevezessük azt a technikát, amivel meg tudjuk figyelni az dimer/monomer állapotban lévő UVR8 mennyiségét a növényi sejtekben (Tissot & Ulm, 2020). Erre azért is volt szükség, hogy lássuk hogyan reagál az az UV-B kezelésre és az azt követő fehér fény alatti regenerációs inkubálásra az endogén UVR8 és az YFP kapcsolt UVR8 molekula (YFP-UVR8) a növényi sejtekben (6. ábra).

Az első mintát UV-B kezelés előtt szedtük, majd a következő mintasorozatot a 30 perc UV-B kezelés lejárta után szedtük. Ekkor az összes UVR8 dimer monomerizálódott mindkét növényi minta esetében, majd kint hagytuk a mintáinkat fehér fényen „regenerálódni”, 60, és 240 percig, majd minden időintervallum elteltével mintát szedtünk.



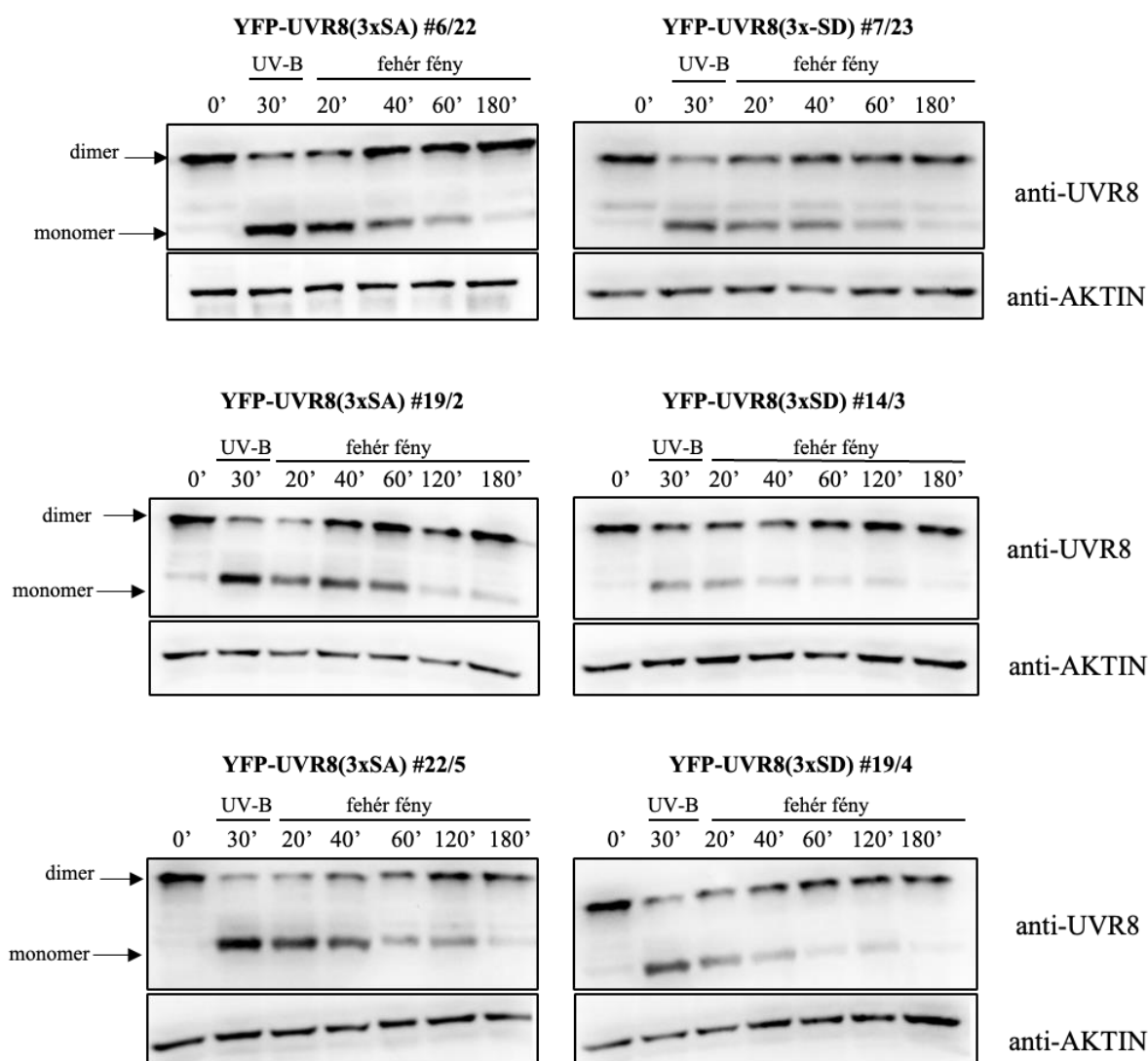
6. ábra. A UVR8 és az YFP-UVR8 monomerizációja és dimerizációja azonos kinetikát mutat.

Hét napos csíranövényeket rövid (30 min) UV-B kezelés után fehér fényen tartottunk 240 percen át, majd western blot analízissel teszteltük őket anti-UVR8 antitesttel. Az (A) ábrán láthatjuk a nem denaturált, azaz nem forralt fehérjemintákat, ahogyan a monomerek (minden mintában az alsó sáv) elkülönülnek a dimerektől (felső sáv). A (B) ábrán a forralt, azaz denaturált minták láthatóak, ahogyan csak a monomerek detektálja az anti-UVR8. Az csíranövények kezelése az alábbi volt: 0': az UV-B kezelés előtti állapot; 30': közvetlenül a 30 min UV-B kezelés utáni állapot, a 60' és 240' pedig a fehér fényen történt regenerációs idők (60 ill. 240 min) elteltével szedett mintákat jelöli.

A regenerációs idő alatt jól látható, ahogy a kezdetben magas UVR8 monomerek szintje a kezdetlen állapotéhoz tér vissza, ahogyan egyre több ideig hagytuk őket fehér fényen. A harminc perc letelte után a dimerek (felső sáv) mennyisége jelentősen lecsökken a monomerek mennyisége (alsó sáv) pedig megemelkedik, mind az UVR8, mind pedig az YFP-UVR8 esetében. Ez a fokozatosság a regeneráció idejének növekedésével jól követhető. Ez alapján a kísérlet alapján végeztük el a többi dimerizációs kísérletet.

6.5. A foszforiláció hatása az UVR8 monomerizációjára és dimerizációjára *in planta*

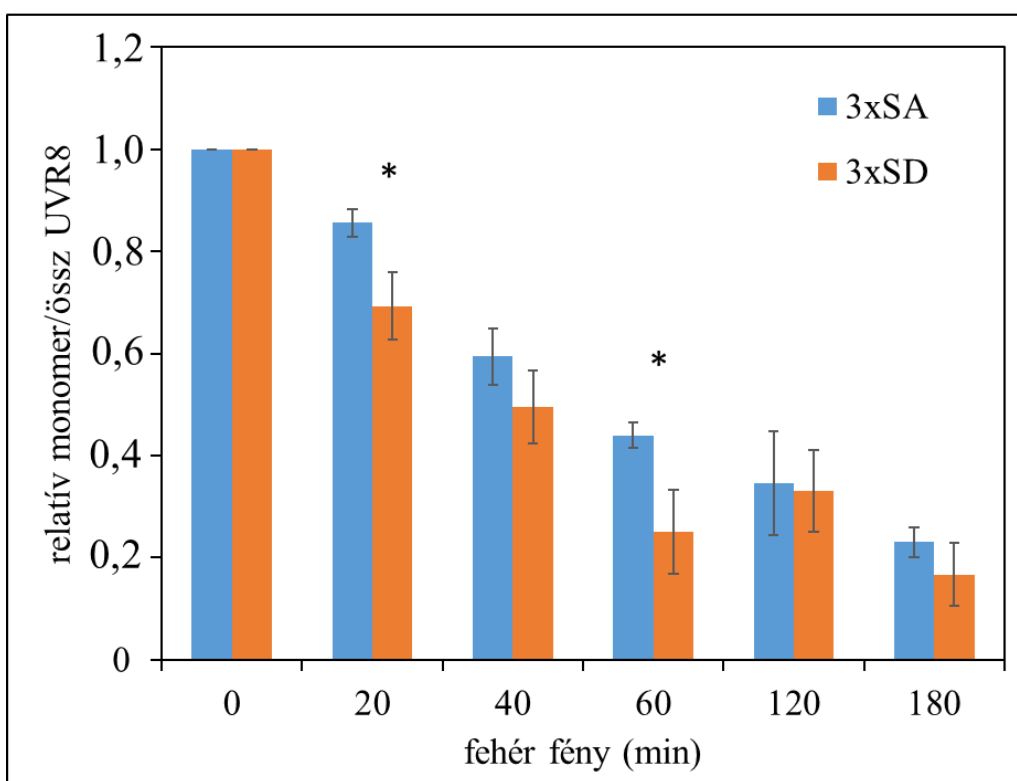
Mivel csoportunk előzetes eredményei azt mutatják, hogy az UVR8(3xSD) foszforilációt utánzó változata erősebben kötődik az UVR8 dimerizációját elősegítő RUP2 fehérjéhez, mint a nem foszforilálódó UVR8(3xSA), ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző foszfo-mutáns UVR8 változatoknak dimerizációja különbözik-e egymástól. Ezeket az UVR8 változatokat kifejező csíranövényeket 30 percig UV-B sugárzással kezeltük, ami monomerek keletkezését indukálta. Ezután fehér fényen „regeneráltuk” mely során a monomerek mennyisége jelentősen lecsökkent dimerizálódásuk révén (6. ábra). Azért, hogy pontosabb összehasonlításokat tehessünk 3-3 független transzformáns vonalat vizsgáltunk meg. Az anti-UVR8 antitestet használva azt állapítottuk meg, hogy mind az YFP-UVR8(3xSA), mind pedig az YFP-UVR8(3xSD) monomerek redimerizációja lezajlik a megfigyelt időtartam (180 perc) alatt. Megfigyeltük azonban azt is, hogy az YFP-UVR8(3xSD) monomerek gyorsabban fogynak el a rendszerből, mint az YFP-UVR8(3xSA) molekulaváltozatok, különösen a regenerációs időszak első órájában gyorsabb (7. ábra).



7. ábra. Az YFP-UVR8(3xSD) dimerizációja gyorsabb, mint az YFP-UVR8(3xSA)-é.

7 napos csíranövényeket világítottunk meg 30 percig UV-B-vel, majd 180 percen át fehér fényel. Ezután nem denaturáló „szemi-natív” western-blot analízissel vizsgáltuk a bennünk levő különböző YFP-UVR változatok dimer és monomer mennyiségét. A membránt újra hibridizáltuk anti-aktin ellenanyaggal, így ellenőrizve a membránra rögzített fehérjék mennyiségét. A transzgenikus vonalak száma utal arra, hogy minden vizsgált vonal a többitől független transzformáns.

A dimerizációs kísérletek során elkészült „szemi-natív” western-blotok képeit (7. ábra) kvantifikáltuk, hogy pontosabb megállapításokat tegyünk a dimerizáció üteméről. Megmértük, külön a monomerekhez és külön a dimerekhez tartozó jelek intenzitását is, ezek összege adta a megfigyelt összes YFP-UVR8 mennyiségét. Ezután az így kapott eredményekből egy arányt számoltunk, amely a monomerek összes UVR8-hoz (dimer+monomer) viszonyított relatív aránya egy adott kezelés hatására. Mivel a dimerizáció sebességét akartuk összehasonlítani, a kiindulási állapotnak a 30 perces UV-B kezelést azonnal követő állapotot tekintettük. Ehhez viszonyítottuk a dimerizáció sebességét (8. ábra). Az YFP-UVR8(3xSD) monomerek mennyisége gyorsabban fogyott, mint az YFP-UVR8(3xSA), azaz gyorsabban dimerizálódott. Ez a különbség 20 és 40 perc regeneráció után szignifikánsnak bizonyult.



8. ábra. Az UVR8 foszforilációja gyorsítja a molekula dimerizálódását,

A 7. ábrán bemutatott „szemi-natív” western blotok (anti-UVR8) alapján az YFP-UVR8 monomerek dimerizálódásának meghatározása. Az egy mintában mérhető monomer/összes UVR8 aránya minden minta kiindulási állapotához (30 min UV-B kezelés után) viszonyítottunk. Az kék oszlop az YFP-UVR8(3xSA), míg a narancssárga oszlop a YFP-UVR8(3xSA) változatot kifejező növényeket jelöli. A hibasávok standard hibát mutatják. A statisztikai elemzést Student-féle t-próbával végeztük el, ez alapján a YFP-UVR8(3xSA) és a YFP-UVR8(3xSA) vonalak hipokotilhossza közt szignifikáns különbség van (* $p < 0,05$).

7. Az eredmények értékelése

A kísérleti rendszerünket az alapján állítottuk be, hogy hogyan tudjuk az UVR8 molekula foszforilált és nem foszforilált állapotát utánózni úgy, hogy kicseréljük a szerin aminosavait. Ennek érdekében olyan genetikai háttérben fejeztük ezeket a módosított UVR8 molekulákat, amely endogén UVR8-at molekulát nem tartalmaz, így annak zavaró hatásától mentesen tudunk fiziológiás vizsgálatokat végezni. Ez a kísérleti elrendezés széles körben elterjedt, használtuk csoportunk korábbi munkáiban (Bernula és mtsai., 2017; Vanhaelewyn, Bernula, és mtsai., 2019; Vanhaelewyn, Viczián, és mtsai., 2019), illetve mások is alkalmazták (Fang és mtsai., 2022; Lin és mtsai., 2020).

Az YFP-hez kapcsolt különböző UVR8 változatokat tartalmazó növényvonalakból western-blot analízis során választottuk ki azokat, amelyekben közel azonos mennyiségű fehérje termelődött és a későbbi kísérleteket ezekkel hajtottuk végre. Mivel a fotoreceptorok a fotomorfogenezis pozitív szabályozói, a nagyobb mennyiségben jelen lévő aktív fehérje erősebb válaszreakciót okoz (Heijde és mtsai., 2013). Ezért volt tehát fontos szempont, hogy az összehasonlítható transzgénikus növényvonalakban a kiméra YFP-UVR8 fehérjék mennyisége közel azonos legyen.

Az UVR8 fotomorfogenezisben betöltött funkcióját a hipokotilmegnyúlás gátlására kifejtett hatásán keresztül mértük le. A korábbi munkákkal összhangban azt értékeltük, hogy a fehér fényvel együtt adott UV-B megvilágítás képes-e kiváltani a fotomorfogénikus választ, azaz gátolni a csíranövények hipokotiljának a megnyúlását (Bernula 2017, Favory 2009). Megfigyeltük, hogy az UVR8(3xSA) változat hatékonyabban UV-B-függő jelátvitelt tud irányítani, mint az UVR8(3xSD), mivel az UVR8(3xSA)-t kifejező növények hipokotiljai jelentősen rövidebbek voltak, mint az UVR8(3xSD)-t kifejezőké. Ebből arra következtethetünk, hogy a nem foszforilált állapotú UVR8 molekula hatékonyabb fotomorfogénikus válaszokat váltott ki, míg a foszforilált állapotot utánzó 3xSD nem tudta megfelelően érzékelni az UV-B jelet.

Régóta ismert tény, hogy a *CHS* mRNS mennyisége UV-B sugárzás hatására UVR8-függően nő (Frohnmeier és mtsai., 2002; Gruber és mtsai., 2010), ezért mi is megmértük ezt a választ a vizsgált csíranövényekben. Eredményeink elemzése után azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az UVR8(3xSA) vonal majdnem ugyanannyi mennyiségű *CHS* mRNS-t tartalmazott, mint a vad típusú Col, míg az UVR8(3xSD) változatban szinte alig emelkedett meg a *CHS* mRNS mennyiség UV-B kezelés hatására. Mivel, hogy a foszforilált UVR8 nem

képes hatékony jelátvitelre, a CHS mennyisége sejtekben alacsony, emiatt azt valószínűsítjük, hogy ha az UVR8 foszforilált, akkor nem indulnak be a növényi sejten belül a védekező mechanizmusok, mint például a fotoprotektív pigmentek termelése. Ennek a jelenségnek a vizsgálata azonban további kísérletek elvégzését igényli.

A fent leírt jelenségek magyarázatát az előzetes eredmények alapján kerestük. Csoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy élesztő kettős-hibrid rendszerben a RUP2 az UVR8(3xSD) változathoz erősebben kötődik, mint az UVR8(3xSA)-hoz. Mivel a RUP2 szerepe az, hogy hozzákapcsolódik az UVR8 monomerekhez és elősegíti azok dimerizációját, ezáltal csökkenti az UVR8 jelátvitel intenzitását (Heijde & Ulm, 2013), ezért az általunk előállított UVR8 változatok, ezért vizsgáltuk meg az általunk előállított UVR8 változatok ezeknek dimerizációját növényi rendszerben. Azért ezt a kísérleti rendszert használtuk, mert ebben valóshoz közeli sugárzási viszonyok között, figyelhetjük meg, hogy hogyan változik az UVR8 aktív formájának a mennyisége a növényi sejtekben. Hasonló kísérleti rendszert mások is használtak korábban (Tissot és Ulm, 2020). A 3xSA, azaz a nem foszforilált állapotot mutató változatok esetében lassabb dimerizáció vehető észre, mint a foszforilált állapotot utánzó 3xSD változatok esetében. Ebből arra következtetünk, hogy a foszforilált állapot feltehetően a RUP1/2 erősebb kötődését eredményezi a monomerek C-terminálisához, ami hatékonyabb dimerizációt eredményez. Ezt a feltételezésünket támasztja alá az a tény, hogy az általunk azonosított foszforilált aminosavak az UVR8 C-terminális régiójában találhatók, ahova a RUP fehérjék kapcsolódnak (Wang és mtsai., 2023). Így tehát a foszforilált UVR8 nem tudja hosszú távon fenntartani a jelátviteli folyamatok működését, mert a monomerjei túl hamar visszaalakultak eredeti, inaktív, homodimer állapotukba.

Egy nemrég megjelent tanulmányban (W. Liu és mtsai., 2024) az UVR8 S402 foszforilációjának hatásait vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a foszforilációt utánzó S402D forma erősebben kötődik a RUP fehérjékhez, de nem dimerizálódik gyorsabban, mint a nem foszforilált., illetve ez a két módosított UVR8 nem képes eltérő fotomorfogenikus válaszok kiváltására. A kutatásunk során mi a 3 egymás közelében lévő szerin foszforilációs állapotát együtt változtattuk meg, ezzel pedig megmagyarázható, hogy miért kaptunk eltérő eredményeket. Adataink értelmezése további vizsgálatokat igényel.

Összegezve a kapott eredményeinket kijelenthetjük, hogy az UVR8 3 kiemelt helyzetű szerin aminosavának a foszforilációja jelentős mértékben csökkenti annak aktivitását, a RUP2 általi inaktív formába alakulás révén. Ez a mechanizmus az UV-B jelátvitelének egy új típusú szabályozási lehetőségét jelenti és a jövőben részletesen vizsgálni kell a növények UV-B sugárzásra adott válaszainak jobb megértéséhez.

8. Összefoglalás

Eredményeink arra utalnak, hogy az UVR8 foszforilált és nem foszforilált állapota között funkcionális különbség van: a foszforilált állapot kevésbé hatékonyan működik, mint a nem foszforilált. Így tehát rávilágítottunk arra, hogy a poszttranszlációs módosítások hogyan képesek befolyásolni az UVR8 működőképességét. Ez a megfigyelés új szabályozási mechanizmusok kutatása előtt nyithat teret. Mivel a foszforilációért kináz enzimek felelősek, ezek működésének szabályozása az UV-B érzékelésre is kihathat. A közelmúltban jelent meg kettő publikáció, melyek részletesen bemutatják, hogy a vörös és távoli vörös fényt érzékelő fitokróm fotoreceptorok B foszforilációját végző kinázok aktivitását a sejten belüli só (X. Liu és mtsai., 2023), illetve a Ca^{2+} szint szabályozzák (Zhao és mtsai., 2023). Ezáltal ezek a környezeti tényezők hatnak a fitokróm B jelátvitelére, így a fotomorfogenezisre. Feltételezzük, hogy ehhez hasonlóan, különböző jelátviteli utak kapcsolódási pontja lehet az UVR8 foszforilációja is. Annak bizonyítása azonban, hogy a foszforilálódás folyamatát egyéb környezeti tényezők (például: szárazság, sóstressz stb.) hogyan befolyásolják az UVR8 jelátvitelét az azt foszforiláló kináz aktivitásának módosításán keresztül, további vizsgálatokat igényel.

A különböző pozíciókban elhelyezkedő szerin molekulák módosításának hatásai még további vizsgálatokat kívánnak a pontos mechanizmus kiderítése érdekében, de ezzel a kutatással megállapíthattuk a jelentős különbségeket a foszforilált és nem foszforilált állapotok közt mind a morfológiai, mind az anyagcserében bekövetkezett változások alapján. További poszttranszlációsan módosított aminosavak azonosítása várható a jövőben, az ezekhez kapcsolódó szabályozási módok felismerésével. Ezek a kutatások hozzájárulhatnak az UVR8 molekula működésének mélyebb megértéséhez, valamint a mezőgazdaság fejlesztéséhez, UV stressz ellen hatékonyabb védekezéshez.

9. Irodalomjegyzék

- Aphalo, P. (2017). Quantification of UV radiation. *CABI*, 10–22. <https://doi.org/10.1079/9781780648590.0010>
- Bernula, P., Crocco, C. D., Arongaus, A. B., Ulm, R., Nagy, F., & Viczián, A. (2017). Expression of the UVR8 photoreceptor in different tissues reveals tissue-autonomous features of UV-B signalling. *Plant, Cell & Environment*, 40(7), 1104–1114. <https://doi.org/10.1111/pce.12904>
- Binkert, M., Kozma-Bognár, L., Terecskei, K., De Veylder, L., Nagy, F., & Ulm, R. (2014). UV-B-responsive association of the Arabidopsis bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 with target genes, including its own promoter. *The Plant Cell*, 26(10), 4200–4213. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130716>
- Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., Kelly, S. M., Hothorn, M., Smith, B. O., Hitomi, K., Jenkins, G. I., & Getzoff, E. D. (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6075), 1492–1496. <https://doi.org/10.1126/science.1218091>
- Fang, F., Lin, L., Zhang, Q., Lu, M., Skvortsova, M. Y., Podolec, R., Zhang, Q., Pi, J., Zhang, C., Ulm, R., & Yin, R. (2022). Mechanisms of UV-B light-induced photoreceptor UVR8 nuclear localization dynamics. *The New Phytologist*, 236(5), 1824–1837. <https://doi.org/10.1111/nph.18468>
- Favory, J.-J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G. I., Oakeley, E. J., Seidlitz, H. K., Nagy, F., & Ulm, R. (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 28(5), 591–601. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.4>
- Frohnmeier, H., Bowler, C., Zhu, J.-K., Yamagata, H., Schäfer, E., & Chua, N. H. (2002). Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UV-regulated expression of chalcone synthase. *The Plant Journal*, 13, 763–772. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00074.x>
- Frohnmeier, H., & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, 133(4), 1420–1428. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030049>
- Galvão, V. C., & Fankhauser, C. (2015). Sensing the light environment in plants: Photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>

Gruber, H., Heijde, M., Heller, W., Albert, A., Seidlitz, H. K., & Ulm, R. (2010). Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 20132–20137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914532107>

Heijde, M., Binkert, M., Yin, R., Ares-Orpel, F., Rizzini, L., Van De Slijke, E., Persiau, G., Nolf, J., Gevaert, K., De Jaeger, G., & Ulm, R. (2013). Constitutively active UVR8 photoreceptor variant in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20326–20331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314336110>

Heijde, M., & Ulm, R. (2013). Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 1113–1118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214237110>

Kliebenstein, D. J., Lim, J. E., Landry, L. G., & Last, R. L. (2002). *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiology*, 130(1), 234–243. <https://doi.org/10.1104/pp.005041>

Lau, K., Podolec, R., Chappuis, R., Ulm, R., & Hothorn, M. (2019). Plant photoreceptors and their signaling components compete for COP1 binding via VP peptide motifs. *The EMBO Journal*, 38(18), e102140. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019102140>

Lin, L., Dong, H., Yang, G., & Yin, R. (2020). The C-terminal 17 amino acids of the photoreceptor UVR8 is involved in the fine-tuning of UV-B signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(9), 1327–1340. <https://doi.org/10.1111/jipb.12977>

Liu, W., Giuriani, G., Havlikova, A., Li, D., Lamont, D. J., Neugart, S., Velanis, C. N., Petersen, J., Hoecker, U., Christie, J. M., & Jenkins, G. I. (2024). Phosphorylation of *Arabidopsis* UVR8 photoreceptor modulates protein interactions and responses to UV-B radiation. *Nature Communications*, 15(1), 1221. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45575-7>

Liu, X., Jiang, W., Li, Y., Nie, H., Cui, L., Li, R., Tan, L., Peng, L., Li, C., Luo, J., Li, M., Wang, H., Yang, J., Zhou, B., Wang, P., Liu, H., Zhu, J.-K., & Zhao, C. (2023). FERONIA coordinates plant growth and salt tolerance via the phosphorylation of phyB. *Nature Plants*, 9(4), 645–660. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01390-4>

Paul, N. D., & Gwynn-Jones, D. (2003). Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(1), 48–55. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00014-9)

Podolec, R., Demarsy, E., & Ulm, R. (2021). Perception and Signaling of Ultraviolet-B Radiation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 72, 793–822.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095946>

Rizzini, L., Favory, J.-J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I., & Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.1200660>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Sullivan, J. A., & Deng, X. W. (2003). From seed to seed: The role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 260(2), 289–297. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00212-4)

Tissot, N., & Ulm, R. (2020). Cryptochrome-mediated blue-light signalling modulates UVR8 photoreceptor activity and contributes to UV-B tolerance in Arabidopsis. *Nature Communications*, 11(1), 1323. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15133-y>

Vanhaelewyn, L., Bernula, P., Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F., & Viczián, A. (2019). UVR8-dependent reporters reveal spatial characteristics of signal spreading in plant tissues. *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 18(5), 1030–1045. <https://doi.org/10.1039/c8pp00492g>

Vanhaelewyn, L., Viczián, A., Prinsen, E., Bernula, P., Serrano, A. M., Arana, M. V., Ballaré, C. L., Nagy, F., Van Der Straeten, D., & Vandenbussche, F. (2019). Differential UVR8 Signal across the Stem Controls UV-B-Induced Inflorescence Phototropism. *The Plant Cell*, 31(9), 2070–2088. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00929>

Wang, L., Wang, Y., Chang, H., Ren, H., Wu, X., Wen, J., Guan, Z., Ma, L., Qiu, L., Yan, J., Zhang, D., Huang, X., & Yin, P. (2023). RUP2 facilitates UVR8 redimerization via two interfaces. *Plant Communications*, 4(1), 100428. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100428>

Wellmann, E. (1976). Specific ultraviolet effects in plant morphogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 24(6), 659–660. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb06889.x>

Yin, R., Arongaus, A. B., Binkert, M., & Ulm, R. (2015). Two distinct domains of the UVR8 photoreceptor interact with COP1 to initiate UV-B signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(1), 202–213. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133868>

Zhao, Y., Shi, H., Pan, Y., Lyu, M., Yang, Z., Kou, X., Deng, X. W., & Zhong, S. (2023). Sensory circuitry controls cytosolic calcium-mediated phytochrome B phototransduction. *Cell*, 186(6), 1230–1243.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.011>

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a dolgozatomban szereplő előzetes eredmények előállításában részt vevő kollégák, Péter Csaba (HUN-REN SZBK), Klement Éva (HUN-REN SZBK), valamint Roman Ulm és Roman Podolec (Genfi Egyetem, Svájc) munkáját.

A dolgozatban leírt kísérleteket a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézetében a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem. Köszönöm a csoportvezetőmnek, Dr. Silhavy Dánielnek, hogy lehetővé tette számomra, hogy bekapcsolódjak a csoport munkájába és Tudományos Diákköri munkámat itt készíthessem el.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Viczián Andrásnak áldozatos munkájáért, a sok segítségért és türelméért, valamint a kutatási munka és a tanulmányaim során adott hasznos tanácsokért, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Mindazonáltal szeretném megköszönni a belső konzulensemnek, Dr. Szepesi Ágnesnek, hogy munkájával hozzájárult a dolgozatom elkészüléséhez, valamint támogatta tanulmányaim folytatását.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, a páromnak és a barátaimnak, hogy támogattak a kutatási munka során.

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap OTKA K-138022-as pályázatának támogatásával készült.

**A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Sípos Lilla** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Az UVR8 fotoreceptor foszforilációjának élettani hatásai *Arabidopsis thaliana* csíranövényben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Magok sterilizálása és a csíranövények felnevelése steril körülmények közt.	5
A western-blot reakciókhoz felnevelt növényi minták begyűjtése és a fehérjeextraktumok elkészítése.	5
Fehérje mennyiség mérés és a fehérjeextraktumok koncentrációjának meghatározása.	5
Hipokotilhossz méréshez szükséges növényi minta nevelése és begyűjtése. Hipokotilhossz mérése számítógépes programmal.	5
A fehérjeminták gél-elektroforézise, blottolása és elemzése western-blot hibridizációval.	5
Az adatok statisztikai feldolgozása.	3
Össz-RNS tisztítás csíranövényekből és qRT-PCR vizsgálatok.	5

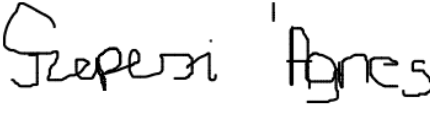
Kelt: 2024.03.27, Szeged


Pályamunkát benyújtó hallgató (név)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét
megerősítem:



HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont


SZTE, TTIK, Növénybiológia Tanszék
Belső konzulens (név, munkahely)
aláírása

Témavezető (név, munkahely)
aláírása