

Plants for the Future Conference

Plant biotechnology for the future of agriculture in the
Central European region conference

September 30-October 2, 2013 in Cluj Napoca, Romania

<http://conference.ubbcluj.ro/plant/>

A konferencián elhangzott előadás összefoglalója

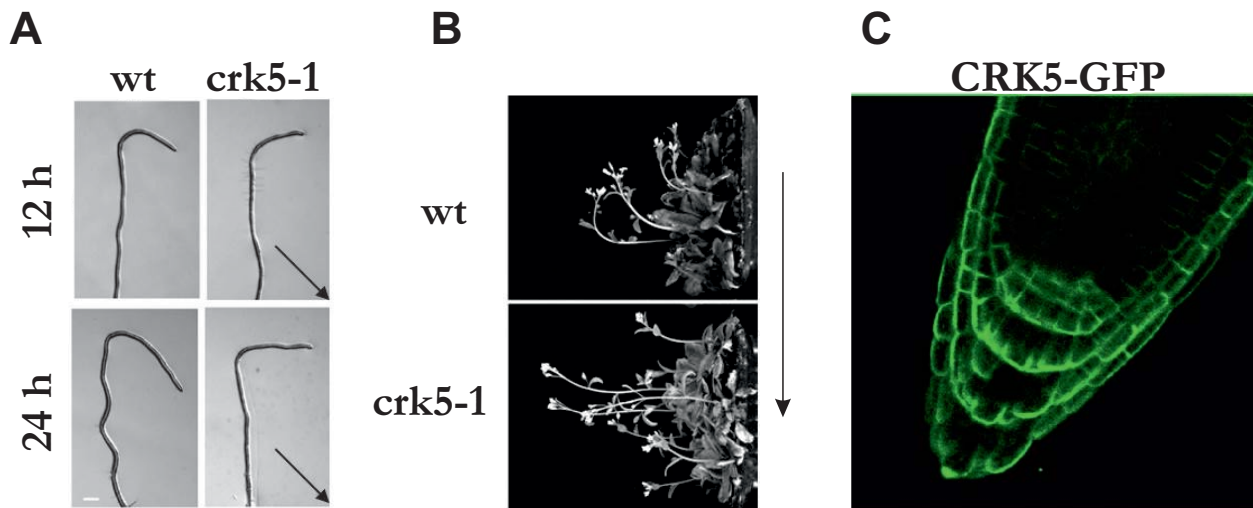
Az abiotikus (gravitropikus, ozmotikus és oxidatív) stressztoleranciát eredményező szabályozási körök felderítése egy gyomnövény mutáns segítségével

Rigó Gábor és Cséplő Ágnes

Az élőlények evolúciója során a földi gravitációs körülményhez való alkalmazkodás alapvető szerepet játszott a fejlődési folyamatokban, a szervek és szervrendszerek kialakulásában és elhelyezkedésében. Ennek következtében mind a szárazföldi, mind a vízi növények esetében a növekedési tengely párhuzamos a földi gravitáció irányával. A magasabbrendű növények esetén, a főgyökér növekedési iránya így mindig a Föld középpontja felé mutat (ún. pozitív gravitropizmus), szemben a fotoszintetizáló hajtással, amely ezzel ellentétes irányban - ún. negatív gravitropizmust mutatva - fejlődik. *Charles Darwin* óta, aki először írta le a gyökér és hajtásfejlődés pozitív, illetve negatív gravitropikus válaszait, felfedezték, hogy a növények a gravitációt - és annak irányát - a keményítő szemcséket tartalmazó kloroplasztiszai és amiloplasztiszai segítségével érzékelik, amely keményítő tartalmú sejteket ún. sztatolitoknak neveztek el. Így a keményítőszintézisben mutáns növények lassan vagy egyáltalán nem képesek növekedésük irányát a gravitáció iránya szerint megváltoztatni. Az is ismertté vált, hogy a sztatolitok gravitációs erő irányában mutatott mozgása megváltoztatja kölcsönhatásukat a mozgásukat biztosító és érzékelő aktin filamentumokkal. A sztatolitok gravitáció irányában történő mozgását és kölcsönhatását a sejtmembránnal számos, membránban elhelyezkedő mechanoreceptor érzékeli különböző jelátviteli utakat és másodlagos hírvivő komponenseket aktiválva. Ezek között a Ca^{2+} -ion kiszabadulás, a Ca^{2+} és kalmodulin (CaM) érzékelés és általuk kiváltott foszforilációs kaszkádok alapvető szerepet játszanak. 1926-ban *N. Cholodny* és *F. W. Went* a kijevei

egyetenemen és *California Institute of Technology*-ban végzett kísérleteikben kimutatták, hogy a gravitációt érzékelő szignálátviteli folyamat a sejtmembránra szabályozó auxin növényi hormon aszimmetrikus eloszlásához (ún. exportjához) vezet. A vízszintes helyzetbe forgatott növényi gyökerek felső sejtrétegeiből auxin transzportálódik az alsó sejtrétegekbe, ami ott gátolja a sejtmembránra szabályozást. A csökkenő auxinszint következtében a felső sejtrétegek megnyúlnak, és így a gyökér a gravitáció irányába elhajlik. Az elmúlt évtizedben az auxintranszport számos részlete tisztázódott az ún. PINFORM (PIN) auxintranszportot végrehajtó membránfehérjék szerepének felfedezésével. Továbbra is megválaszolatlan maradt azonban az a fontos kérdés, hogy a gravitációs stimulust jelző másodlagos Ca^{2+} /CaM-szignál milyen módon szabályozza az aszimmetrikus auxinexportot, sejtmembránra szabályozást és ez által a gyökerek pozitív geotropikus növekedési válaszát. A 2013-ban közölt cikkünk (Rigó *et al.* 2013, *The Plant Cell*, Vol.25:1592-1608) betekintést nyújt ennek a folyamatnak egyes részleteibe egy szerin-treonin típusú proteinkináz, a CRK5, jellemzésén keresztül. Ez a kináz az eddig jórészt ismeretlen funkciójú, nyolctagú, *Arabidopsis*-ban is előforduló CRK protein kinázcsalád tagja és - mint az kutatási eredményeink alapján kiderült - foszforiláció révén szabályozza a molekuláris genetika modellnövényében, az út szélén is előforduló gyomnövényben, az *Arabidopsis thaliana*-ban (lúdfűben) a gyökerek gravitropikus válaszában kulcsszerepet játszó PIN2 fehérje auxintranszportban betöltött funkcióját.

Munkánkban kimutattuk, hogy a CRK5 proteinkináz alapvető szerepet játszik az *Arabidopsis* gyökér és szár gravitropikus mozgásának szabályozásában (1. ábra). Huszonnégy órával a 135° elfordítást követően a vad típusú (wt) *Arabidopsis* gyökerek teljesen befordulnak a gravitációs vektor iránya felé, míg ugyanennyi fordulási idő és fok esetében a mutáns (CRK5 proteinkináz nem tartalmazó) *crk5-1* gyökerek csak 90 fokos fordulásra képesek (1A. ábra). A vad típusú (wt) *Arabidopsis* virágzati tengely 90 fokos elfordítást követően normális geotropizmust mutat, míg a *crk5-1* mutáns növény virágzati tengelye csak 45 fokos fordulásra képes (1B. ábra). A CRK5 proteinkináz inaktiválása tehát gátolja a gyökér és virágzati tengely normális gravitropikus mozgását.



1. ábra A CRK5 proteinkináz szerepet játszik az *Arabidopsis* gyökér és szár gravitropikus mozgásának szabályozásában (A, B). A CRK5 proteinkináz fluoreszcens fehérjével jelzett alakja (CRK5-GFP) jellegzetesen kifelé néző, U-alakú lokalizációs mintázatot mutat a gyökérsüvegben (C). A fekete nyilak a gravitációs vektor irányát jelölik.

Ennek oka az auxin eloszlásának megváltozásában kereshető, mivel ennek a növényi hormonnak a gyökér, illetve szárbeli megoszlása befolyásolja a gravitropikus válaszképességet. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a *crk5-1* mutáns gyökérben nem alakul ki az az aszimmetrikus auxingrádiens, ami gravitropikus inger hatására a normális (vad típusú) gyökér elfordulását okozza. Vizsgálataink szerint a CRK5 protein kináz *in vitro* foszforilálja a PIN2 fehérjét. Ez a PIN2 fehérje a gyökér bazipetális auxin körforgásának kulcsfontosságú eleme, és kísérleteinkben kimutattuk, hogy ez az efflux auxintranszporter a vad típusú PIN2 lokalizációtól eltérően lokalizálódik a *crk5-1* mutánsban. A PIN2 fehérje sejten belüli, a plazmamembrán megfelelő (a bőrszövetben csúcsi, a fiatal kortexsejteken alapi) részén történő elhelyezkedéséhez elengedhetetlen annak megfelelő foszforiláltsági állapota. Ennek hiányában a PIN2 fehérje lokalizációja zavart szenved. Mivel a CRK5 kináz a PIN2 molekula citoplazma felé néző hidrofíl burok régióját foszforilálja, a CRK5 proteinkináz inaktiválódása a *crk5-1* mutánsban a PIN2 protein nem megfelelő foszforilálódását eredményezi,

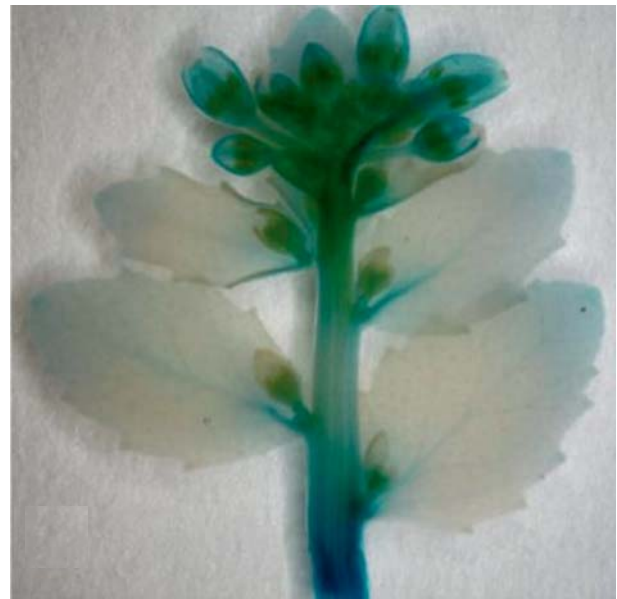
aminek következtében a PIN2 fehérje normális lokalizációja zavart szenved, következésképpen az auxin körforgás is sérülést szenved a gyökércsúcsi régióban, ami végső soron a gravitropikus ingerre bekövetkező gyökérelhajlás jelentős késéséhez vezet. Így a *crk5-1* mutáns segítségével sikerült a CRK5 proteinkináz egyik, a gyökér gravitropizmus szabályozásában betöltött funkcióját igazolnunk. Kutatásaink további érdekessége, hogy a zöld fluoreszkáló protein riporter fehérjével megjelölt proteinkináz (CRK5-GFP) segítségével újabb fontos információ birtokába jutottunk a kináz esetleges további funkcióját illetően. A CRK5-GFP proteinkináz a gyökérsüveg sejtjeiben kifelé néző, laterális lokalizációt mutat (1C. ábra). Ehhez hasonló, sejten belüli lokalizációs mintázatot *Arabidopsis*-ban a bórtranszporter fehérje (BOR4) esetében írtak le ez idáig (Miwa *et al.* 2007, Takanoa *et al.* 2010). Ez a kapcsolatos, kifelé néző mintázat arra utal, hogy a CRK5 proteinkináz a gyökér mikroelem- és vízfelvétel szabályozásában is részt vehet. E felvételi folyamatok részletes tanulmányozása jövőbeni céljaink között szerepel.



A szakértők előrejelzései szerint a globális klímaváltozás következményeként a növények terméshozama Európa tekintélyes részén szignifikánsan (akár az eddigi 20 %-ára) fog csökkenni. Jelenleg a legkritikusabb környezeti faktorok közé a szárazság, a hőség, az extrém hideg és a talaj sótartalmának megnövekedése, az elszikesedés tartozik. A növények stressztűrésének, alkalmazkodási képességének megnövelése ezért kulcsfontosságú tényező a túlélés és adaptáció során. Így kutatásaink további célja, hogy a CRK5 proteinkinázt megvizsgáljuk és jellemezzük más abiotikus, pl. az ozmotikus és oxidatív stresszválaszok szempontjából is. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a CRK5 proteinkináz egyik mutáns alléja hosszabb gyökeret fejleszt magas sókoncentráció jelenlétében, mint a vad típusú allél (Rigo *et al.* 2010). Ez azt jelenti, hogy a CRK5 proteinkináz valószínűleg szerepet játszik az ozmotikus stressztolerancia kialakításában is. Azt is kiderítettük, hogy a CRK5 kinázt nem tartalmazó mutáns növények gyökerében megváltozott a nitrogén-monoxid (NO) szintje, ami arra utal, hogy a kináz szerepe lehet az oxidatív stresszválasz kialakításában is. A NO egy multifunkcionális szignálmolekula, amely sokrétű szabályozó szerepet játszik a növények fejlődési folyamataiban (Kolbert *et al.* 2010, Fernandez-Marcos *et al.* 2011, Lehotai *et al.* 2012, Freschi 2013). A CRK5 proteinkináz transzgenikus úton létrehozott funkcióvesztéses mutánsának eddigi tanulmányozása kiderítette, hogy ez a szerin-treonin típusú kináz az abiotikus – gravitropikus, ozmotikus és oxidatív – stresszválasz szabályozásában is jelentős szerepet játszhat.

Jövőbeni terveink között szerepel, hogy megvizsgáljuk az *Arabidopsis* gyökerek CRK5 proteinkináz által szabályozott mikroelem-, és vízfelvétellel kapcsolatos kapacitását, illetve megvizsgáljuk a CRK5 proteinkináz NO jelátvitelben játszott szerepét, különös tekintettel a poláris auxintranszportban döntő szerepet játszó PIN2 efflux hordozó fehérjére, amely meg-

határozza az *Arabidopsis* gyökerek gravitropikus irányultságát. Továbbá szeretnénk részletesen tanulmányozni a CRK kinázcsalád többi tagjának is az abiotikus stresszválasz során betöltött lehetséges szerepét. Így pontosabb képet kaphatunk arról, hogy a jelenleg nagyrészt ismeretlen funkciójú CRK proteinkinázcsalád milyen szerepet játszik az abiotikus stresszválasz szabályozásában. Ezzel értékes információkat nyerhetünk arról, hogy egy adott fehérjecsalád - jelen esetben a CRK proteinkináz-család - segítségével hogyan képesek a növények szembeszállni és alkalmazkodni az állandóan változó, manapság egyre gyakrabban extrémításokat mutató környezeti hatásokkal, változásokkal szemben.



Irodalomjegyzék:

- Fernández-Marcos, M., Sanza, L., Lewis, D.R., Muday, G.K., Lorenzo, O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. PNAS, 108: 18506–18511.
- Freschi, L. (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. Front. Plant Science, 4:398. doi:10.3389/fpls.2013.00398
- Kolbert, Z., Ortega, L., Erdei, L. (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. J. Plant Physiol., 167: 77–80.
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Peto, A., Feigl, G., Ordog, A., Kumar, D., Tari, I., Erdei, L. (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. J. Exp. Bot., 63(15): 5677–5687.

Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Fujiwara, T. (2007) Plants tolerant of high boron levels. *Science*, 318: 1417.

Rigo, G., Ayaydin, F., Kovács, H., Szabados, L., Cseplo, A. (2011) AtCRK5, a CDPK-related serine/threonine protein kinase may participate in regulation of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. In: Palocz-Andresen, M., Nemeth, R., Szalay, D. (szerk.) TÁMOP-Humboldt Colleg for Environment and Climate Protection, Sopron, Hungary 3rd December 2009 & 1st October 2010. Sopron: University of West Hungary, 2011. pp. 70–74.

Rigo, G., Ayaydin, F., Tietz, O., Zsigmond, L., Kovacs, H., Pay, A., Salchert, K., Darula, Z., Medzihradzsky, K.F., Szabados, L., Palme, K., Koncz, Cs., Cseplo, A. (2013) Inactivation of plasma membrane-localized CDPK-RELATED KINASE5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25:1592–1608.

Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fujii, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T. (2010) Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci.*, 107/16: 5220–5225.

Köszönetnyilvánítás

A projekt végrehajtását a K81765. számú OTKA grant, valamint a Magyar-Román Kétoldalú Tudományos és Technológiai Együttműködés (TET_12_RO_1-2013-0010) grant teszi lehetővé. A projekt egy része (TET_12_RO_1-2013-0010) az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósul meg.

