

Szamóca szövet- és érés-specifikus gének promotereinek izolálása TAIL-PCR-rel és a szekvenciák bioinformatikai elemzése

Koncz Tímea^{1,2} – Tisza Viktória¹ –
Balogh Andrea³ – Kiss Erzsébet¹ –
Heszky László¹

¹Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

²Országos „Frédéric-Joliot Curie”

Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet,
Izotóp-alkalmazási és Állatkísérletes Osztály, Budapest

³Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő
tkoncz@yahoo.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A specifikus promoterek izolálása az utóbbi években kiemelt fontosságúvá vált a genetikai és élettani kutatásokban. Amellett, hogy lehetőséget ad a génexpresszió szabályozásának feltárására, célzott expresszióval az alkalmazott biotechnológiai kutatásokban is jelentős előrehaladások várhatóak. Munkánkban öt, szamócából izolált érés- és szövet-specifikus gén promotert izoláltuk és jellemeztük bioinformatikai módszerekkel. Az érés-specifikus ACC-oxidáz (amely az etilén bioszintézis egyik kulcsenzime, és az utóérő gyümölcsökben közvetlenül kapcsolódik az érés folyamatához) és *Spatula* gének promotor régióiban sikerült auxinhoz és etilénhez kötődő cisz szabályozó elemeket azonosítanunk, megerősítve az eddigi feltételezéseket, hogy a nem-utóérő szamóca esetében is van összefüggés az etiléntermelés és az érés folyamata között. Három, zöld receptákulumban expresszázó gén (nitrilázszerű fehérje, Ring transzkripció faktor, aquaporin fehérje) promotor régióját is megvizsgáltuk, ezekben is több, hormonális szabályozásra utaló elemet azonosítottunk. Mind az öt gén promotor szekvenciájában találtunk több stresszválással kapcsolatos elemet, valamint endospermium-specifikus expressziót biztosító motívumokat.

Kulcsszavak: *Fragaria × ananassa* Duch., specifikus promoterek, érés, receptákulum, bioinformatika

SUMMARY

Isolation of ripening- and tissue-specific promoters has become a very important subject of the genetic regulation and plant physiology research in recent years. It could be possible to reveal the regulation of gene expression, and it may be a very useful approach in the biotechnology. In our work, we have isolated promoter regions of genes exhibiting ripening- and tissue-specific expression in our previous experiments, and the data were characterized by bioinformatic methods. In the sequence of the ripening-specific *Spatula* and ACC-oxidase promoters (ACC-oxidase is one of the key-enzymes of ethylene biosynthesis, directly related to the process of ripening); we could identify auxin- and ethylene-related cis-regulatory elements. This suggests that there is an interaction between ripening and ethylene-synthesis, in case of non-climacteric strawberry, too. We investigated the promoter regions of three green receptacle-specific genes (putative nitrilase-like protein, Ring transcription factor and an aquaporin protein) and we could identify several regulatory elements, which refer to hormonal regulation. Additionally, we could find several cis-

acting elements which associated with stress-responsiveness and endospermium-specific expression.

Keywords: *Fragaria × ananassa* Duch., specific promoters, ripening, receptacle, bioinformatics

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gének előtt 5'upstream irányban elhelyezkedő szabályozó régió, a promotor, mely a mögötte elhelyezkedő gén expresszióját befolyásolja, az utóbbi években kiemelt szerepet kapott a növényélettani és szabályozásgenetikai kutatásokban. Elsősorban olyan promoterekre koncentrálnak, amelyek működése nem konstitutív, hanem valamely sejt- vagy szövettípusra jellemző, illetve kiváltható külső fizikai vagy kémiai hatással. Az ilyen irányú kutatások azért is jelentősek, mert a specifikus promoterek azonosítása olyan eszközt adhat a növénygenetikuskok kezébe, amellyel képesek a kiválasztott gének expresszióját célzottan befolyásolni, illetve a gének időbeni és térbeli funkciójáról információt adni. A szamóca esetében még kevés olyan szekvencia áll rendelkezésre, amely ilyen célra alkalmazható, ezek közül sorolunk fel néhányat:

- Endo-β-1,4 glükánázok közé tartozó *FaEG1*; 3 (Spolaore et al., 2003)
- Feltételezett MADS-box *STAG1* (Rosin et al., 2003)
- Egy D-galakturonsav reduktáz *GalUR* (Agius et al., 2003)
- Lipid transzfer protein *Faxltp* (Yubero-Serrano et al., 2003)
- Strukturális sejtfa fehérje *Fahyprp* (Blanco-Portales et al., 2004)
- Citoszolikus aszkorbát peroxidáz *Apx SC* (Kim és Chung, 1998)

A promoterek ismerete genomikai szempontból is fontos, mivel hozzájárulhat a génszabályozás, valamint a különböző élettani folyamatok megértéséhez, illetve a köztük levő kölcsönhatások feltárásához.

A promotor régiók izolálására többféle technikát alkalmaznak. Kezdetben a genomi könyvtárakat ismert szekvenciájú cDNS-ekkel screenelték.

Ez a technika azonban drága és időigényes, ezért fordultak egyre inkább a PCR-alapú technikák felé. Az ide sorolható inverz-PCR (Ochman et al., 1988) és az adapter-ligálással kombinált PCR (Rosenthal és Jones, 1990) esetében azonban problémát jelentett olyan minőségű DNS izolálása, amely megfelelő volt a tökéletes endonukleázos emésztéshez. A módszerekben a következő lépés a TAIL-PCR

(Thermal Assymetric Interlaced-PCR) kifejlesztése volt (Liu és Whittier, 1995). Ez a technika a PCR-en kívül nem igényel semmilyen járulékos módszert. Három egymást követő PCR reakcióban szerepelnek a degenerált, valamint az ismert szekvencia 5' végére specifikus primerek meghatározott kombinációkban (1. ábra).

1. ábra: A TAIL-PCR-ben alkalmazott primerek elhelyezkedése

A degenerált primer a keresett szekvenciában kötődik. A génspecifikus primereket (S1, S2, S3, S4) az ismert szekvencia alapján tervezzük meg, az 5' véghez lehetőleg minél közelebb. Sárgával jelöltük a transláció kezdetét jelző start kodont (ATG), kékkel pedig az előtte elhelyezkedő nem átíródó (UnTranslated Region) szekvenciát.

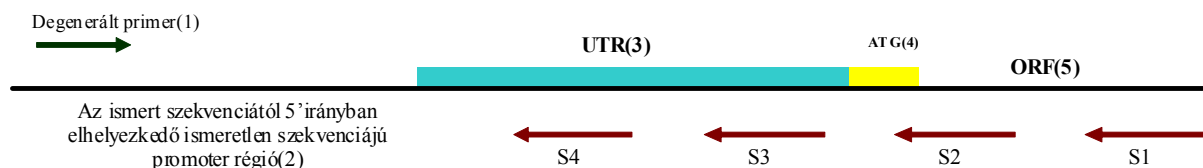


Figure 1: Locations of primers used in TAIL-PCR. Degenerated primer binds in the unknown region. The gene-specific primers (S1, S2, S3, S4) are designed based on the sequence of known sequence of 5'UTR (if it is identified) or ORF (open reading frame) as close as possible to the 5' end

Degenerate primer(1), 5'upstream unknown sequence of promoter region(2), untranslated region(3), start codon(4), open reading frame(5)

Az általunk alkalmazott módosított TAIL-PCR-t (2. ábra) Michiels és munkatársai (2003) fejlesztették ki.

Az eredeti TAIL-PCR-ben (Liu és Whittier, 1995) 16 bp hosszúságú degenerált primereket alkalmaztak a génspecifikus primerek mellett. A ciklusoktat ennek megfelelően alacsony és magas kapcsolódási hőmérsékleteket kombináltak, hogy a specifikus és nem-specifikus primerek egyaránt képesek legyenek a DNS-templáthoz való kötődésre. A módszernek több hátránya is volt: a felszaporított fragmentumok többségének mérete nem haladta meg az 1 kb-t, és komplex genomok esetében a PCR hatékonysága is jelentősen csökkent. Ezeknek a problémáknak az áthidalására több módosítást is alkalmaztak a későbbiekben. A Michiels és munkatársai által kifejlesztett módszerrel képesek voltak komplex növényi genomból is nagy hatékonysággal 1 kb-t meghaladó promóter régiót izolálni (Michiels et al., 2003). Az eredeti leíráshoz képest hosszabb (26 bp) génspecifikus primereket alkalmaztak, és két kontroll-reakció beillesztésével sikerült elkülöníteniük a specifikus és nem specifikus termékeket.

Munkánk során külön vizsgáltuk a különböző érési stádiumokban, az aszmagban, valamint a receptakulumban expresszáldó géneket. A receptakulum a szamóca esetében nem a valódi termés része, hanem az elhúsosodott vacok. Három olyan gén promóter régióját azonosítottuk, amely az előzetes cDNS-AFLP és szemi-quantitatív RT-PCR vizsgálatok alapján (Balogh et al., 2005) csupán a zöld receptakulumban expresszáldódik, ezek a következők: cink-ujj (zinc-finger) típusú fehérje, feltételezett nitriláz és aquaporin fehérje.

A cink-ujj fehérje egy *Arabidopsis*ből származó C3HC4 típusú RING finger fehérjével mutatja a

legnagyobb homológiát, míg nukleotid szinten a görögdinnyéből (*Citrullus lanatus* Thunb.) izolált RING fingerrel. A RING finger fehérjék számos szervezetben fontos szerepet játszanak a fejlődés szabályozásában. Növényekben eddig csak néhányat jellemeztek funkcionálisan.

A második szövet-specifikus gén fehérje szinten egy *Arabidopsis*ből izolált feltételezhetően nitriláz-szerű proteinnel mutatja a legnagyobb homológiát. A nitrilázok képesek a nitrileket a megfelelő karboxilsavvá hidrolizálni, így szerepük lehet az IES bioszintézisében is, amely a természetben legnagyobb mennyiségben előforduló auxin. Szamócában már írtak le közvetlen kapcsolatot az aszmag auxintermelése és a gyümölcs érése között (Manning, 1994).

Szintén szövet-specifikus expressziót mutat az a gén, amely egy almából izolált plazma membránba ágyazódó (Plasma membrane intrinsic protein – PiP) aquaporin fehérjével adja a legnagyobb homológiát fehérje szinten. Ez szerepet játszik a gyümölcs megnagyobbodásában és stresszt kiváltó körülmények között a víz homeosztázis fenntartásában (Hu et al., 2003).

Két, érés-specifikus expresszióval jellemezhető gén promóterét is izoláltuk. Ez a további vizsgálatok szempontjából nagyon fontos, mivel a szamóca kitűnő modellnövény a nem-utóérő gyümölcsök érési folyamatainak vizsgálatában. Ismert, hogy az utóérő, vagyis klimatikus gyümölcsök esetében az érés jól jellemezhető egy etiléntermelési csúccsal (Giovannoni, 2004). Ilyet nem-utóérőknél még nem tudtak azonosítani, bár az érés kései fázisában sikerült etiléntermelést kimutatni szamócából *in vivo* (Perkins-Veazie et al., 1996). Azt azonban nem sikerült még egyértelműen bizonyítani, hogy a szamóca által termelt etilén az érési folyamatokkal

van-e szoros összefüggésben, vagy pedig stressz-indukálta etilén. Mivel az etiléntermelés egyik kulcsenzime az ACC-oxidáz (Yang és Hoffman, 1984), a gén promotérének jellemzése segítséget nyújthat az etilén szerepének tisztázásában is.

A másik érés-specifikus gén, a *Spatula*, fehérje szinten *Arabidopsis*-ből izolált fehérjével mutatja a legnagyobb homológiát. Neve a mutánsok esetében megjelenő fenotípusos elváltozásra, a spatula alakú termésre utal. Funkcionálisan transzkripció faktor, mely szerkezetét tekintve basic-helix-loop-helix fehérje (Heisler et al., 2001). Ez azt jelenti, hogy tartalmaz egy alap spirál-hurok-spirál domént.

Kísérleteinkben azokból az eredményekből indultunk ki, amelyeket (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Elsanta') cDNS-AFLP módszerrel kaptunk a szamóca gyümölcs-fejlődésében és érésében működő gének meghatározása során. Olyan transzkriptumokat választottunk, amelyek feltételezhetően érés-specifikus, illetve receptákulum-specifikus expressziót mutatnak. Ezek promóter régióit izoláltuk az általunk meghatározott teljes hosszúságú cDNS szekvenciák alapján (Balogh et al., 2005) TAIL-PCR módszerrel, majd a kapott szekvenciákat bioinformatikai elemzés alá vetettük.

ANYAG ÉS MÓDSZER

DNS-izolálás

A reakciókban alkalmazott DNS-t Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit-tel vontuk ki fiatal levelekből (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Marmolade) a gyártó előírásait követve. Azért választottuk ezt a módszert, mert a TAIL-PCR-hez nagyon jó minőségű DNS szükséges, és több kité, illetve hagyományos módszert összehasonlítva ez adta a legjobb eredményt. Módosításként utólag 1 órás RNáz kezelést alkalmaztunk, 37°C-os inkubációs hőmérsékleten. A DNS kvalitatív és kvantitatív jellemzésére a mintákat 0,8%-os agaróz gélen megfuttattuk, valamint NanoDrop készülékkel megmértük a DNS koncentrációját és tisztaságát.

Módosított TAIL-PCR

Kísérleteinkben a Michiels és munkatársai által leírt módosított TAIL-PCR módszert alkalmaztuk (Michiels et al., 2003). A 2. ábrán látható, hogy épül egymásra az egymást követő három PCR-reakció. Mindhárom reakciót BioRad iCycler típusú készülékben végeztük el, a reakció végtérfogata mindhárom esetben 20 µl volt. A kiindulási reakcióban 80 ng DNS-t használtunk fel. A mastermix összetétele 1 mintára: 0,2 µM génspecifikus primer, 2 µM degenerált primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,6 U Taq polymerase (1U/µl, WestTeam Biotech, Pécs), 10x puffer, 20 nM MgCl₂ (25 mM). A reakció hőmérsékleti körülményeit az 1. táblázat tartalmazza. A TAIL-PCR reakciókban alkalmazott primerek a 2. táblázatban vannak feltüntetve.

1. táblázat

Az első PCR reakció hőmérsékleti és idő profilja

Ciklusok száma(1)	Tm (°C)	Időtartam(2)
1	93	1 min
	95	5 min
5	94	30 sec
	62	1 min
1	72	2,5 min
	94	30 min
	25-72	3 min
15	72	2,5 min
	94	20 sec
	68	3,5 min
	94	20 sec
	68	3,5 min
	94	30 sec
	42	1 min
72	2,5 min	
1	72	5 min
	4	∞

Table 1: Temperature and time profile of the first TAIL-PCR reaction

Number of cycles(1), duration(2)

A reakcióban *ACO Pro1*, *Spa Pro1*, *Ring Pro1*, *PiP Pro1*, *Nit Pro1* génspecifikus primereket (2. ábra: S1) alkalmaztunk. Minden primert kipróbáltunk az irodalmi adatok alapján kiválasztott hat degenerált primerrel (2. ábra: AD), és a további két reakcióban is e szerint a rendszer szerint használtuk őket.

Második reakció: Templátként az előző reakció termékének 50-szeres hígításából használtunk fel 1 µl-t. A mastermix összetétele azonos volt, az egyetlen változtatás a génspecifikus primer volt. A reakció paramétereit a 3. táblázatban foglaltuk össze. A reakciókban szereplő génspecifikus primerek: *ACO Pro2*, *Spa Pro2*, *Ring Pro2*, *PiP Pro2*, *Nit Pro2* (2. ábra: S2).

A harmadik reakcióban templátként a második reakció termékének 10-szeres hígításából vettünk ki 1 µl-t. A mastermixet a következők szerint állítottuk össze: 0,2-0,2 µM génspecifikus és degenerált primer, 0,8 mM dNTP, 20 nM MgCl₂ (25 mM), 1 U Taq Polimerase (1 U/µl, WestTeam Biotech, Pécs), 10× puffer. A reakció körülményeket az 4. táblázatban tüntettük fel. A nem specifikus termékek kiszűrésének érdekében két kontroll reakciót is alkalmaztunk. Az elsőnél egy újabb génspecifikus primert, a második esetben pedig csak degenerált primereket használtunk.

A reakciókban szereplő génspecifikus primerek: *ACO Pro3-ACO Pro4*, *Spa Pro3-Spa Pro4*, *Ring Pro3-Ring Pro4*, *PiP Pro3-PiP Pro4*, *Nit Pro3-Nit Pro5* (2. ábra S3, S4). A degenerált primereket (2. ábra: AD) az előbbieken leírtak szerint alkalmaztuk.

2. ábra: A módosított TAIL-PCR

A módosított TAIL-PCR-ben a három egymást követő reakció kapcsolatát, valamint a primerek elhelyezkedését mutatja az ábra. Minden reakciót hat különböző degenerált primerral indítottuk (AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6), melyeket a megfelelő specifikus primerekkel használtunk párban. Az első reakcióban az S1-gyel jelölt primereket alkalmaztuk, a másodikban az S2-nek, a harmadikban pedig az S3-nak és az S4-nek megfelelőeket. A harmadik PCR esetében, amely az első kontroll reakció, a degenerált primer az S3 gén-specifikus primerral használva közel azonos méretű terméket szaporít fel, mint az S4 gén-specifikus primerral. Ezek a fragmentumok átfedik az ismert szekvencia előtti 5' upstream régiót. A beillesztett gélfotó a nitriláz gén promoterének felszaporítását szemlélteti. A második kontrollban csak degenerált primerek vannak jelen, így minden felszaporított termék aszpecifikus, a gélfotón három ilyen ampikon látható (az is előfordulhat, hogy egyáltalán nem kapunk az AD primerrel PCR terméket).

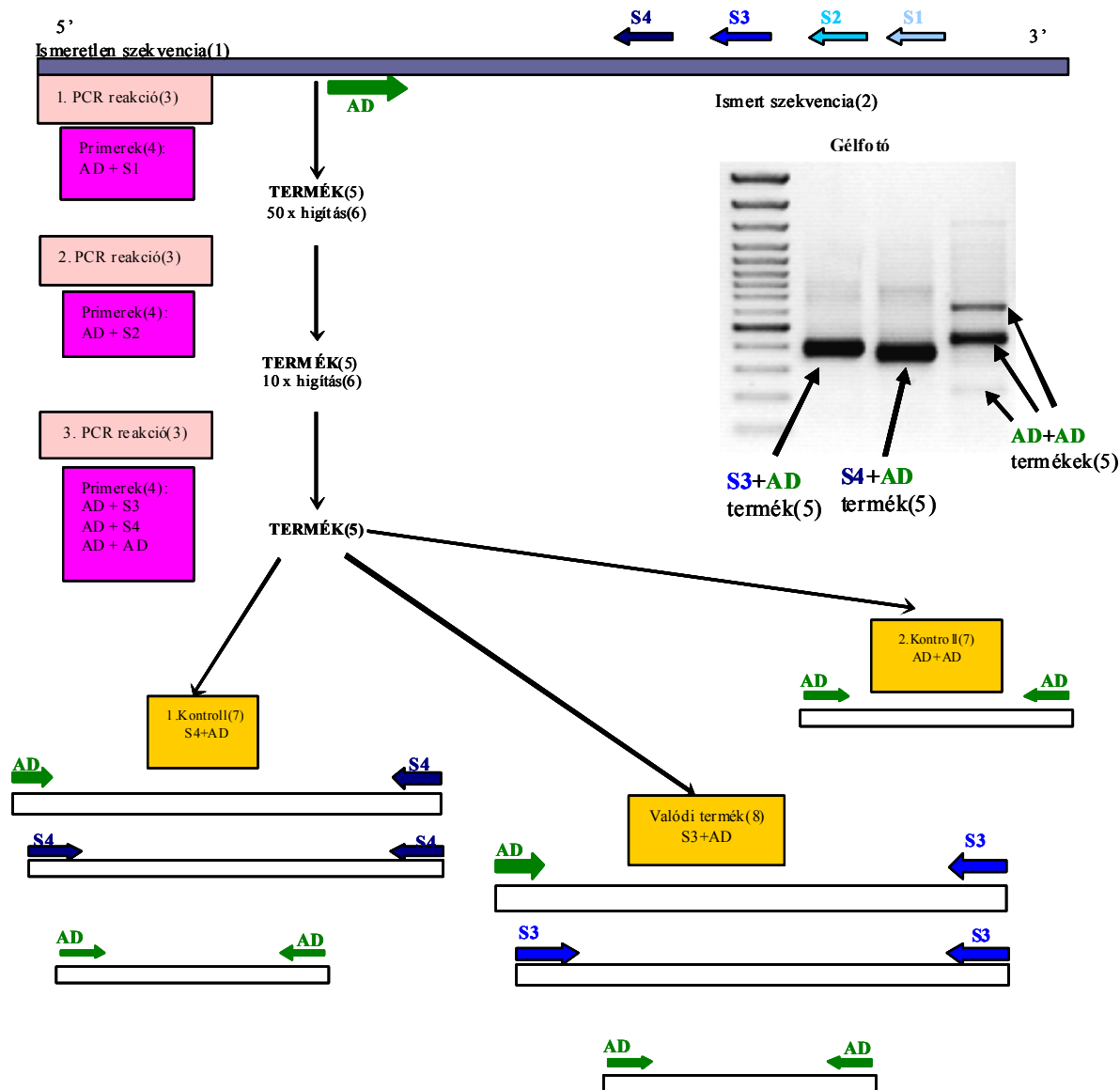


Figure 2: The modified TAIL-PCR. The schematic figure presents the relationships between the three PCR reactions and locations of the primers. The pink and yellow boxes show the specific and degenerate primers used in reactions. At first, we started six reactions with six different degenerate primers paired with the corresponding gene-specific primers S. The following reactions were carried out with the same degenerate primers and the next gene-specific primers. In the third PCR, which is the first control reaction, S3 gene-specific primer was used with the AD degenerate primer. The size of the amplified fragment was similar to the amplicon obtained with a degenerate primer and an S4 gene specific primer. These two fragments overlap the 5' upstream region of the known sequence. In the second control reaction, only non-specific fragments are present; therefore, all the amplicons are aspecific products (there are three of these aspecific amplicons in the Gélfotó). In the gel photo (Gélfotó), the third reaction of the TAIL-PCR can be seen in the case of Nitrilase promoter. The size-difference between the amplified fragments due to the location of the two specific primers can be clearly recognized. These fragments are not present when only degenerate primers are used

Unknown sequence(1), known sequence(2), PCR-reaction(3), primers(4), product(5), dilution(6), control(7), real product(8)

A TAIL-PCR-ben alkalmazott génspecifikus és degenerált primerek

Primer neve(1)	Primer szekvenciája(2)	n (bp)	Tm (°C)
ACO Pro1	5' - CGT GTC CAG AAA CAC AGT GGG TAT - 3'	24	62,0
ACO Pro2	5' - CCA TGA TTC ACC AGC TCA AAG AAA CCC CAG TTC - 3'	33	67,0
ACO Pro3	5' - CTT GAC TTC TCT CTC TGG CTC TT - 3'	23	60,0
ACO Pro4	5' - CTC TTT CTC TCG AGT GTT GGC TCA A - 3'	25	62,0
SPA Pro1	5' - CTA TCA TTG CTC GGA CTG CCG AGA T - 3'	25	63,6
SPA Pro2	5' - GAC TCT GAG CAA CTG AGA CCG AAG A - 3'	25	63,2
SPA Pro3	5' - TCC TAT TGC TCT GTT TCA GA - 3'	20	53,7
SPA Pro4	5' - GAA CTG CTG TCC GGT CAA AGA CGA AG - 3'	26	65,1
SPA 5' RACE	5' - CTT GGA TGA GTT TGG GAG CTG AAA - 3'	24	60,2
Ring Pro 1	5' - ACT TGA GAG ACC CAT TTA GCA GAT GCA CAA GT - 3'	32	64,6
Ring Pro 2	5' - TCT GAT GGA GCT GGG AGA CTT GAG AGA CCC ATT - 3'	33	68,2
Ring Pro 3	5' - GGA GGA TGG ATC TCA CTA GGC CCT TGA TGA T - 3'	31	67,3
Ring Pro 4	5' - TGA AGC CGG TGA GGC TGA GGA TGA AGA TGA - 3'	30	67,4
2443M007 Pro1	5' - CCT TGC CGT CGT CCT GGC TCT GA - 3'	23	67,0
2443M007 Pro2	5' - ACT TGT TGG CTC CCA AGC TCA CAT CT - 3'	26	64,0
2443M007 Pro3	5' - CCT CCT TGG CCT CCA TGA TCG TAG TAG A - 3'	28	66,0
2443M007 Pro4	5' - AAC GAC TGC GTT TGA TGT GAT TGA AG - 3'	26	60,0
Nit Pro 1	5' - GGG CAG CTT GGA CAT TGT TTG TTC T - 3'	25	62,0
Nit Pro 5	5' - GGA AAG CTG GGA GCA GAG AGT GTG TGT - 3'	27	66,5
Nit Pro 3	5' - GTA AAA GAT GAG CCT TGA GCT - 3'	21	56,0
Nit Pro 4	5' - CCG CTG CTG ACT CCA CGA CCC ATA T - 3'	25	66,9
AD1	5' - TGA GNA GTA NCA GAG A - 3'	16	
AD2	5' - CAT CGN CNG ANA CGA A - 3'	16	
AD3	5' - NTC GAS TWT SGW GTT - 3'	15	
AD4	5' - TGW GNA GWA NCA SAG A - 3'	16	
AD5	5' - NGT CGA SWG ANA WGA A - 3'	16	
AD6	5' - WGT GNA GWA NCA NAG A - 3'	16	

Table 2: Gene-specific (S) and degenerate (AD) primers used in the TAIL-PCR reactions
Primer name(1), primer sequence(2)

3. táblázat

A második TAIL-PCR reakció hőmérsékleti és idő profilja

Ciklusok száma(1)	Tm (°C)	Időtartam(2)
12	94	20 sec
	65	3,5 min
1	94	20 sec
	65	3,5 min
	94	30 sec
	42	1 min
	72	2,5 min
	72	5 min
	4	∞

Table 3: Temperature and time profile of the second TAIL-PCR reaction
Number of cycles(1), duration(2)

4 táblázat

A harmadik TAIL-PCR reakció jellemzői

Ciklusok száma(1)	Tm (°C)	Időtartam(2)
30	94	30 sec
	42	1 min
	72	2,5 min
1	72	5 min

Table 4: Temperature and time profile of the third TAIL-PCR reaction
Number of cycles(1), duration(2)

Ligálás, klónozás

A kapott fragmentumokat TA-klónozással építettük be pGEM®-T Easy vektorba (Promega, BioScience Kft., Budapest), amellyel *Escherichia coli* kompetens sejteket (INVαF, Invitrogen, Csertex Kft., Budapest) transzformáltunk.

Kolónia PCR után a rekombináns plazmidokat Promega Wizard® Plus Miniprep DNA Purification kittel (BioScience Kft., Budapest) izoláltuk. A szekvenálás M13 univerzális primerekkel történt ABI Prism 310 szekvenáló készüléken (Applied Biosystems) a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben (Gödöllő).

Szekvencia-elemzés

A szekvenálási eredményeket BioEdit programmal illesztettük össze, illetve ellenőriztük a szekvenálás helyességét. Az ilyen alapon valószínűsített promoterrégiók bioinformatikai elemzését PlantCare programmal (Lescot et al., 2002) végeztük, mely azonosítja a szekvencián található már leírt cisz-elemeket.

EREDMÉNYEK

A TAIL-PCR módszerrel az öt promoter régió esetében 448 és 1567 bp közötti méretű DNS szakaszokat szaporítottunk fel. Szekvencia-összehasonlítással és kísérletesen is igazoltuk, hogy

valóban az adott gén előtt 5' irányban helyezkednek el. Először a promoter szekvenciákat összeillesztettük a rendelkezésre álló cDNS illetve 5'UTR szekvenciákkal, majd azonosítottuk a TAIL-PCR-ben használt génspecifikus primerek kötőhelyeit. A 3. ábrán láthatóak a cDNS-ek, az 5'UTR-ek, valamint a promoter szekvenciák mérete és a translációs startkodonok elhelyezkedése. Ezután a promoterek szekvenciáira forward primereket terveztünk. Ezeket a TAIL-PCR-ben használt génspecifikus primerekkel genomi DNS-en teszteltük, majd a kapott fragmentumokat szekvenáltattuk (nem közölt adat). Ezzel kísérletesen is bizonyítottuk, hogy az általunk izolált szekvenciák a gének előtt 5' irányban helyezkednek el.

Miután a kapott szekvenciákat promoter régióként azonosítottuk, bizonyítottuk, hogy az általunk alkalmazott Michiels et al., által módosított TAIL-PCR számóca (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) esetében is alkalmas ismert szekvenciákhoz 5' irányban kapcsolódó szabályozó régiók izolálására. A 3. ábrán szemléltetjük, hogy az egyes gének előtt mekkora promoter régiót sikerült felszaporítanunk.

3. ábra: A TAIL-PCR-rel izolált promoterek méretei

Az ábrán kék színnel jelöltük a nem átiródó régiókat (UTR), sárgával pedig a translációs start kodont (ORF: open reading frame)

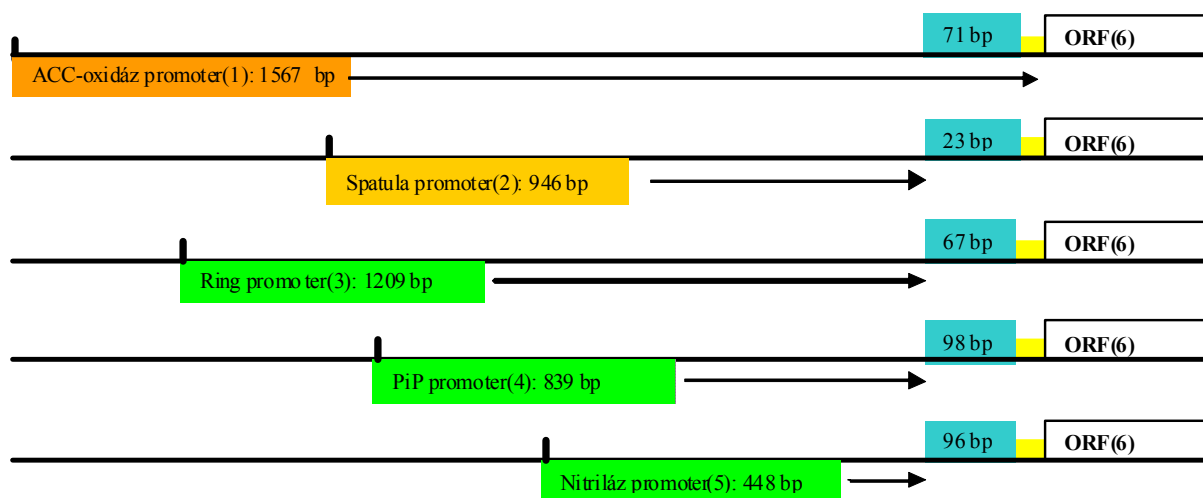


Figure 3: Sizes of the isolated promoter regions. UTRs are marked with blue box, yellow boxes show the site of the ATG start codon (ORF: open reading frame)
ACC-oxidase promoter(1), spatula promoter(2), ring promoter(3), plasma membrane intrinsic protein promoter(4), nitrilase promoter(5), open reading frame(6)

A PlantCare programmal több olyan elemet azonosítottunk, amely valamilyen hormonhatáshoz köthető. Az 5. táblázatban foglaltuk össze, hogy mely gén promoterrégiójában milyen hormonválaszra utaló elemek találhatóak.

Az AuxRR-core elem kivételével mindkét érés-specifikus expressziót mutató gén (Spatula és ACC-oxidáz) promoterében közös motívumokat azonosítottunk. Az AuxRR-core motívumot csak az ACC-oxidáz promoterében találtuk meg, a Spatulában nem. Ennek vagy az a magyarázata,

hogy a Spatula promoterének izolálásában még nem jutottunk el 5' irányban ehhez a motívumhoz, vagy pedig ez az elem nincs benne a promoterben. Auxinválasszal áll kapcsolatban a TGA-box is, amely pozitívan befolyásolja az auxin-indukálhatóságot (Tabata et al., 1989). A boxhoz bZIP típusú transzkripciós faktorok kötődnek (Katagiri et Chua, 1992).

Megfigyelhető az is, hogy bizonyos elemek többször is megtalálhatóak az adott promoterrégiókban, de azt, hogy ennek a

génműködés szabályozása során milyen szerepe van, a rendelkezésre álló adatok alapján, csupán bioinformatikai eszközökkel nem lehet megjósolni. Bizonyos esetekben egynél több cisz szabályozó elem jelenléte szükséges néhány transzkripciós faktor stabil kötődéséhez (Ulmasov et al., 1999). Ennek bizonyítására már folynak a génexpressziós vizsgálatok. Ilyen jelenséggel talákoztunk az ERE esetében, ahol négy ilyen elemet azonosítottunk a

Spatula, kettőt pedig az ACC-oxidáz valamint a nitriláz-szerű proteint kódoló gén promoterében. A Spatula és az ACC-oxidáz gén érés-specifikusnak bizonyult, ugyanakkor az etilén-bioszintézisben résztvevő géncsaládok egyes tagjai auxinnal indukálhatóak. A szamócában bizonyították, hogy az auxin gátolja az érést (Manning, 1994). Ennek az ellentmondásnak a feloldására további vizsgálatok szükségesek.

5. táblázat

Az érés- és szövet-specifikus gének promotereiben található hormonválaszhoz kötött elemek szekvenciája és ismétlődésük száma

Hormon(1)	Motívum neve(2)	Szekvencia(3)	Gén(4)	Ismétlődések száma(5)
Abszcizinsav	ABRE	ACGT	Spatula	4
			ACC-oxidáz	3
			PiP	3
Auxin	AuxRR-core	GGTC	ACC-oxidáz	1
			Ring	2
	TGA-box	TGAC	ACC-oxidáz	1
			Spatula	1
			TGA-elem	AACG
Etilén	ERE	ATTT	Spatula	4
			ACC-oxidáz	2
			Nitriláz	2
Gibberellin	P-box	CCTT	Ring	3
	TATC-box	TATC	PiP	4
			ACC-oxidáz	2
			Spatula	1
			Ring	1
			CGTCA-motívum	CGTCA
TGACG-motívum	TGACG	ACC-oxidáz	3	
		Spatula	2	
Metil-jazmonát	CGTCA-motívum	CGTCA	ACC-oxidáz	3
			Spatula	2
			ACC-oxidáz	3
			Spatula	2
Szalicilsav	TCA-elem	AGAA	Nitriláz	1
			ACC-oxidáz	3
			Spatula	1
			Ring	3

Table 5: Sequences and number of repeats of the elements involved in hormone-response
Hormone(1), name of the motifs(2), sequence(3), gene(4), number of repeats(5)

Az abszcizinsav-válaszért felelős elemek is megtalálhatók mindkét érés-specifikus gén promoterében, ami további megerősítést ad arra, hogy az ABA szabályozza az érési folyamatokat. Ebben a két esetben is többször megismétlődnek a motívumok. Az abszcizinsav endogén hormon antagonistaként gátolja a gibberellin bioszintézisét, illetve az általa indukált biokémiai folyamatokat. Ennek megfelelően a két gén promoterében gibberellin-választ szabályozó elemek is azonosíthatóak, ami a két hormon kölcsönhatására szolgálthat bizonyítékot. Ismert, hogy egyes bHLH típusú fehérjék az abszcizinsav válaszreakcióban is közreműködnek. Az abszcizinsav-válaszért felelős elem – a stresszválaszért felelős elemek mellett (HSE, MBS, Wun-motívum) – a PiP gén promoterében is jelen van. Ez összhangban áll azzal,

hogy az alma PiP gén is szerepet játszik a stresszhatások alatti víz homeosztázis fenntartásában. Néhány stressz-válaszért felelős elem is megtalálható a promoterekben (6. táblázat).

A magas hőmérsékleti stresszel illetve a sebzéssel kapcsolatos elemek az összes általunk elemzett szekvenciában szerepelnek (7. táblázat)

Több motívum endospermium-specifikus expresszióval van kapcsolatban, melyek az érés, valamint a szövet-specifikus promoterekben is jelen vannak (7. és 8. táblázat). Ilyen a GCN4, melyhez az Opaque2 bZIP protein kapcsolódik a reguláció során (Albani et al., 1997), valamint a prolamin box, melyhez a DOF típusú zinc-finger fehérjék képesek kapcsolódni (Mena et al., 1998). Ezeket együttesen bifaktoriális endospermium boxnak nevezik (Marzábal et al., 1998).

A promoterekben található különböző szabályozó elemek. Közülük több a stressz indukálta szabályozásban játszik szerepet

Motívum neve(1)	Szekvenciája(2)	Funkciója(3)
GCN4	GTCA/GCCA	endospermium-specifikus expresszióban szerepet játszó cisz szabályozó elem(4)
Prolamin-box	AAAG	GCN4 motívummal együtt vesz részt a szabályozásban(5)
Skn-1	GTCAT	endospermium-specifikus expresszióhoz szükséges cisz szabályozó elem(6)
ACA	ACA	endospermium-specifikus expressziót negatívan szabályozza(7)
RY-elem	CATG	mag-specifikus szabályozásban szerepet játszó cisz szabályozó elem(8)
Boksz-W1	TTGA	fungális elicitor(9)
EIRE	TTCG	elicitor válaszban szerepet játszó elem(10)
ELI-Box3	AAAC	elicitor válaszban szerepet játszó elem(11)
GC	CGCG	enhancer-szerű elem, anoxikus indukálhatóság(12)
HSE	GAAA	magas hőmérsékleti stressz(13)
MBS	CAAC	MYB-kötőhely, szárazság-indukálhatóság(14)
Wun	AATT	sebzés-indukálhatóságban játszik szerepet(15)
A-box	TAAC	alfa-amiláz promoterekben konzervatív szekvencia(16)
MRE	AACC	MYB-kötőhely, fény-indukálhatóságban játszik szerepet(17)
MSA-szerű elem	AACG	sejtciklus-szabályozásban szerepet játszó cisz szabályozó elem(18)
As-2-box	GATA	hajtás-specifikus expresszió(19)

Table 6: Different cis-regulatory elements in the isolated promoter regions. Some of them play a role in stress-induced regulation processes

Name of motifs(1), sequence of motifs(2), function(3), cis-regulatory element involved in endosperm expression(4), cis-acting regulatory element associated with GCN4(5), cis-acting regulatory element required for endosperm-specific expression(6), negative regulation of endosperm-specific expression(7), cis-acting element involved in seed-specific expression(8), fungal elicitor(9), elicitor-responsive element(10), elicitor-responsive element(11), enhancer-like element, anoxic inducibility(12), heat shock element(13), MYB-binding site involved in drought-inducibility(14), wound-responsive element(15), sequence conserved in alpha-amylase promoters(16), MYB-binding site involved in light responsiveness(17), cis-acting regulatory element involved in cell-cycle regulation(18), shoot-specific expression(19)

Nem hormonhatással összefüggő elemek az érés-specifikus promoterekben

<i>ACC</i> -oxidáz	A-box[1], Box-W1[3], EIRE[2], GC-motívum[4], GCN4[2], HSE[7], MBS[1], MRE[3], MSA-szerű[1], Prolamin-box[2], RY-elem[2], Skn1-motívum[4], Wun-motívum[15]
<i>Spatula</i>	A-box[1], ELI-box[1], GCN4[3], HSE[10], Prolamin-box[1], Wun-motívum[8], as-2-box[1]

[a promoterekben azonosított motívumok ismétlődésének száma](1)

Table 7: Non-hormone related regulatory elements in the ripening-specific promoters

[Number of repeats of motifs identified in promoter sequences](1)

A zöld receptákulum szövet-specifikus promotereiben található nem hormonhatással kapcsolatos szabályozó elemek

<i>Ring</i>	A-box[2], ATC-motívum[4], Box-W1[1], GC-motívum[3], GCN4z[3], HSEz[4], MBS[1], MRE[3], Wun-motívum[10]
<i>PiP</i>	A-box[2], ACA-motívum[1], Box-W1[2], EIRE[2], GC-motívum[6], GCN4[1], HSE[3], MBS[2], MRE[2], RY-elem[1], Skn1-motívum[1], Wun-motívum[5]
<i>Nit</i>	EIRE[1], ERE[2], GCN4[1], HSE[1], Prolamin-box[1], Skn-1 motívum[1], Wun-motívum[3]

[a promoterekben azonosított motívumok ismétlődésének száma](1)

Table 8: Non-hormone related regulatory elements in the green receptacle-specific promoters

[Number of repeats of motifs identified in promoter sequences](1)

Az ACA motívumhoz MYB proteinek kötődnek (Suzuki et al., 1998). Ez a motívum a GCN4-gyel együtt feltétlenül szükséges a tartalék mag fehérjék (seed storage protein) endospermium-specifikus expressziójának szabályozásához. A GCN4 pozitív hatású szabályozó elem, az ACA szupresszája az endospermiumon kívül a többi szövetben az expressziót. Az ACGT és Prolamin-box nem nélkülözhetetlen az endospermium specifikus expresszióhoz, csupán annak mértékét befolyásolja.

A bioinformatikai elemzéssel azonosított hormon-, stressz- és endospermium-specifikus elemek lehetővé teszik annak megvizsgálását, hogy milyen kezelésekkel lehet a promoterek aktivitását befolyásolni. Az eddigi eredmények alapján a hormon-indukálta promoterek funkcionális vizsgálata rejti az egyik legbiztosabb perspektívát. Lehetőséget ad arra, hogy feltárjuk az auxin és az etilén kapcsolatát a szármóca fejlődésében, valamint vizsgálhassuk a két hormon szerepét a nem klimakterikus gyümölcsök érésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatásokat az Országos Tudományos Kutatási Alap támogatta (OTKA 037861, M3663).

IRODALOM

- Agius, F.-González-Lemothe, R.-Caballero, J. L.-Muñoz-Blanco, J.-Botella, M. A.-Valpuesta, V. (2003): Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21. 177-181.
- Albani, D.-Hammond-Kosack, M. C. U.-Smith, C.-Conlan, S.-Colot, V.-Holdsworth, M.-Bevan, M. W. (1997): The Wheat Transcriptional Activator SPA: A Seed-Specific bZIP Protein That Recognizes the GCN4-like Motif in the Bifactorial Endosperm Box of Prolamin Genes. *Plant Cell*, 9. 171-184.
- Balogh, A.-Kocz, T.-Tisza, V.-Kiss, E.-Heszky, L. (2005): Identification of ripening-related genes in strawberry fruit by cDNA-AFLP. *International Journal of Horticultural Science*, 11. 33-41.
- Blanco-Portales, R.-López-Raéz, J. A.-Bellido, M. L.-Moyano, E.-Dorado, G.-González-Reyes, J. A.-Caballero, J. L.-Muñoz-Blanco, J. (2004): A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Molecular Biology*, 55. 763-780.
- Giovannoni, J. J. (2004): Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16 Suppl: 170-180.
- Heisler, M. G. B.-Atkinson, A.-Bylstra, Y. H.-Walsh, R.-Smyth, D. R. (2001): SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development*, 128. 1089-1098.
- Hu, C. G.-Hao, Y. J.-Honda1, C.-Kita1, M.-Moriguchi, T. (2003): Putative PIP1 genes isolated from apple: expression analysis during fruit development and under osmotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 54. 390. 2193-2194.
- Katagiri, F.-Chua, N. H. (1992): Plant transcription factors: Present knowledge and future challenges. *Trends Genet.*, 8. 22-27.
- Kim, I. J.-Chung, W. I. (1998): Isolation of a genomic DNA containing a cytosolic ascorbate peroxidase gene (*ApxSC*) from the strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62. 7. 1358-1363.
- Lescot, M.-Déhais, P.-Thijs, G.-Marchal, K.-Moreau, Y.-Van de Peer, Y.-Rouzé, P.-Rombauts, S. (2002): PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acid Res.*, 30. 325-327.
- Liu, Y.-Whittier, R. (1995): Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25. 674-681.
- Manning, K. (1994): Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194. 62-68.
- Marzábal, P.-Busk, P. K.-Ludevid, M. D.-Torrent, M. (1998): The bifactorial endosperm box of γ -zein gene: characterization and function of the Pb3 and GZM *cis*-acting elements. *The Plant Journal*, 16. 1. 41-52.
- Mena, M.-Vicente-Carbajosa, J.-Schmidt, R. J.-Carbonero, P. (1998): An endosperm-specific DOF-protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from a prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *The Plant Journal*, 16. 1. 53-62.
- Michiels, A.-Tucker, M.-Van Den Ende, W.-Van Laere, A. (2003): Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-rich plant genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21. 295-302.
- Ochman, H.-Gerber, A. S.-Hartl, D. L. (1988): Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120. 3. 621-623.
- Perkins-Veazie, P. M.-Huber, D. J.-Brecht, J. K. (1996): *In vitro* growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. *Ann Appl Biol.*, 128. 105-116.
- Rosenthal, A.-Jones, D. S. (1990): Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.*, 18. 10. 3095-3096.
- Rosin, F. M.-Aharoni, A.-Salentijn, E. M. J.-Schaart, J. G.-Boone, M. J.-Hannapel, D. J. (2003): Expression patterns of a putative homolog of AGAMOUS, STAG1, from strawberry. *Plant Science*, 165. 959-968.
- Spolaore, S.-Trainotti, L.-Pavanello, A.-Casadoro, G. (2003): Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo-b-1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 54. 381. 271-277.
- Suzuki, A.-Wu, C. Y.-Washida, H.-Takaiwa, F. (1998): Rice MYB protein OSMYB5 specifically binds to the AACAA motif conserved among promoters of genes for storage protein glutelin. *Plant Cell Physiol*. 39. 5. 555-559.
- Tabata, T.-Takase, H.-Takayama, S.-Mikami, K.-Nakatsuka, A.-Kawata, T.-Nakayama, T.-Iwabuchi, M. (1989): A protein that binds to a *cis*-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science*, 245. 965-967.
- Ulmasov, T.-Hagen, G.-Guilfoyle, T. J. (1999): Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *PNAS USA*, 96. 5844-5849.
- Yang, S. F.-Hoffmann, N. E. (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 35. 155-189.
- Yubero-Serrano, E. M.-Moyano, E.-Medina-Escobar, N.-Muñoz-Blanco, J.-Caballero, J. L. (2003): Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *Journal of Experimental Botany*, 54. 389. 1865-1877.