

Doktori (Ph.D.) értekezés tézise

**FELISMERÉSEK A NITROGÉN OXID SEJTOSZTÓDÁST ÉS
DIFFERENCIÁCIÓT SZABÁLYOZÓ TULAJDONSÁGÁRÓL
LUCERNÁBAN**

ÖTVÖS KRISZTINA

Témavezető: Dr. Fehér Attila

MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Funkcionális Sejtbiológia Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola
Molekuláris és Sejtbiológia Doktori Program



Szeged

2006

BEVEZETÉS

Az 1980-as évek elejéig a nitrogén oxid biológiai jelentőségéről nem voltak információink. Az azóta eltelt 30 évben bebizonyosodott, hogy az NO növényekben olyan különböző fiziológiai folyamatokban működik közre, mint a betegségek elleni védekezés és az abiotikus stresszre adott válasz kialakítása, a sejthalál és az öregedés (szeneszcencia) folyamatai. Fejlődési regulátorként szerepe van továbbá a gyökér fejlődésében, a csírázásban és a különböző hormon válaszok összehangolásában. Ezen utóbbi megfigyelések alapján arra következtethetünk, hogy az NO közvetlen vagy közvetett módon befolyásolja a sejtelongációt és a sejtosztódást, e két a növényi morfogenezist alapvetően meghatározó folyamatot. Habár az NO jelátviteli út és a sejt osztódását és differenciációját szabályozó folyamatok kapcsolata emlős sejtekben kellőképpen megalapozott, növényekben azonban egyáltalán nem tisztázott az NO sejtciklusra gyakorolt hatása.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogy a nitrogén oxid, mint egy növekedési és fejlődési regulátor,

- részt vesz-e a növényi sejtek osztódásának szabályozásában és
- van-e szerepe a szomatikus embriogenezis folyamatának elindításában.

Ehhez két kísérleti megközelítést használtunk. A lucerna (*Medicago sativa* ssp. varia A2) levélsejtekből izolált protoplasztok tenyészetét, ahol a sejtosztódás reaktivációja és a szomatikus embriogenezis első lépései jól tanulmányozhatók és egy folytonosan osztódó dedifferenciált sejt kultúrát, amely kiválóan alkalmas a sejtciklus nyomonkövetésére.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Növényi technikák:

Lucerna (*Medicago sativa* ssp. varia A2) levélprotoplaszt izolálása és tenyésztése

Lucerna (*Medicago sativa* ssp. varia A2) gyökér eredetű kalluszsövetből származó szuszpenzió sejt kultúra szinkronizálása kettős foszfát éheztetéssel

Citológiai módszerek:

A levélprotoplaszt eredetű sejtek életképességének, morfológiájának és osztódásának meghatározása

Az S fázis arányának megállapítása BrdU (bróm-deoxi-uridin) sejt magi DNS-be történő beépülésének immunocitológiai kimutatása

Áramlásos citometria

Az NO fluoreszcens kimutatása DAF-2 DA-val (4,5-diaminofluoreszcein diacetát)

Fehérje vizsgálati módszerek:

Fehérje extrakció és immunoblot

CDK aktivitás meghatározása

Génexpressziós vizsgálatok:

RNS izolálás és RT-PCR analízis

EREDMÉNYEK

A sejtosztódás és a differenciáció tanulmányozásának egyik legjobb *in vitro* kísérleti rendszere, a sejtfal nélküli egyedi növényi sejtek pl. a levélszövetből izolált protoplasztok szintetikus táptalajban tenyésztett sejt kultúrája. Noha a protoplaszt izolálás során a sejtek kétség kívül nagyfokú stressznek vannak kitéve, kísérleti bizonyítékok demonstrálják, hogy a megfelelően kezelt protoplasztok gyorsan visszanyerik az ép sejtekre jellemző tulajdonságokat és hasonlóképpen reagálnak a hormonális és stresszhatásokra, mint teszik azt intakt társaik.

Kísérleteink során a táptalajhoz adagolt kémiai ágensekkel, nitrogén oxid donorokkal (pl. SNP, SNAP), nitrogén oxid szintáz (NOS) inhibitorral (pl. L-NMMA) és a nitrogén oxidot megkötő, ún. „NO fogó” (pl. PTIO) vegyületekkel befolyásoltuk a vizsgált jelátvivő endogén koncentrációját.

I. Az NO hatása növényi sejtek osztódásának szabályozására.

Kísérleti eredményeink alapján, miszerint a NOS inhibitor L-NMMA és az NO fogó PTIO csökkentette, az NO donor SNP és társai pedig serkentették a lucerna protoplaszt eredetű sejtek S fázis frekvenciáját és osztódását, elmondható, hogy a nitrogén oxid szerepet játszik a levélszövetek dedifferenciációjához ill. osztódásához vezető jelátviteli kaszkádban. A fenti hatás határozottan NO dependens, hisz az L-NMMA gátolt BrdU beépülés és a Medsa;CDKA;1,2 kináz aktivitás csökkenése SNP kezeléssel revertálható. Az SNP hatása koncentráció függő, 1 és 10 μM elősegíti, míg 100 μM már gátolja a DNS replikációját.

A NOS inhibitor L-NMMA-val végzett kezelés tanulsága szerint, csak a három naposnál fiatalabb protoplaszt eredetű sejtek voltak érzékenyek a NOS inhibitor jelenlétére. Ezeknek a sejteknek a kezelése a sejtciklus S-fázisába való belépést késleltette.

Ahogy az L-NMMA nem befolyásolta a három napnál idősebb levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklus progresszióját, úgy a folytosan osztódó ugyanazon lucerna genotípusból származó sejtszuszpenzióét sem, de késleltette a foszfátéheztetett és a stacionárius (11 napos) állapotban lévő sejtek sejtciklusba való belépését. 10 és 100 μM SNP sem befolyásolta a lucerna szuszpenziósejtek sejtciklus progresszióját. Ugyanakkor a sejtek NO érzékenységét (100 μM SNP) vaséheztetett sejt kultúrában a ferritin fehérje felhalmozódásával bizonyítani tudtuk, tehát az NO-ra kapott sejtciklus válasz hiánya nem a sejtek általános NO inszenzivitásának a következménye.

A protoplaszt eredetű sejtek L-NMMA és SNP kezelésre adott exogén auxin koncentrációtól függő reakciója és a megfigyelés, miszerint auxin hiányában az SNP nem képes elősegíteni a protoplaszt eredetű sejtek osztódását, arra enged

következtetni, hogy az NO megváltoztatja a sejtek auxin érzékenységét vagy/és részt vesz az auxin indukált folyamatokban. Ezen feltételezésünket támasztja alá kísérleti eredményünk, miszerint az NO donor SNP-nek az auxin regulált *Aux28* gén (melynek terméke az auxin válaszban résztvevő gének kifejeződését gátolja) relatív expressziójára negatív hatása van lucerna protoplaszt eredetű sejtekben.

Az NO növényi sejtek osztódására kifejtett hatását az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. NO donorok, meghatározott koncentrációban, exogén auxin koncentráció függő módon segítik elő lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklusának reaktivációját.
2. Az NO befolyásolja az auxin jelátviteli utat.
3. A NOS gátlószer (L-NMMA) késlelteti a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek sejtciklusának aktivációját, de annak progresszióját nem.
4. A sejtciklus aktivációjának lucerna levéleredetű sejtekben van egy NO érzékeny szakasza, mely valószínűleg egy NOS-szerű enzim aktivitásához köthető.
5. NO donorok nem befolyásolják az exponenciálisan osztódó lucerna sejt kultúra sejt ciklusának progresszióját, holott azok reagálnak a NO kezelésre (ferritin).

II. Az NO szerepe a szomatikus embriogenezis folyamatában.

Az *MsSERK1* gén a répa és az *Arabidopsis* *SERK* gén lucerna ortológja és a szomatikus valamint a zigotikus embriogenezisben vesz részt. A *SERK* gén expresszióját alapvetően embriogén markernek vélik, habár az auxin indukálta

gyökérképződésben is szerepe van, ezért inkább morfogén, mint embriogén markernek tekinthető.

Az NO donor SNP kezelés hatására alacsony (1 μ M) 2,4-D jelenlétében embriogén típusú sejtek jelentek meg a táptalajban, olyanok, amilyenek magas (10 μ M) 2,4-D hatására képződtek volna. Az *MsSERK1* gén erős kifejeződése és a sejtek további fejlődése szomatikus embriók kialakulásához vezetett.

A NOS inhibitor L-NMMA jelenlétében még magas (10 μ M) 2,4-D hatására is elongált, vakuolizált sejtek jelenlétét detektáltuk. Az embriogén sejtek kialakulását azonban az L-NMMA nem blokkolta, inkább lassította, amit a *SERK* gén kifejeződése ill. a sejtek további fejlődése is alátámasztott.

Az NO szomatikus embriogenézisre kifejtett hatását az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Az NO részt vesz a 2,4-D indukált embriogén sejtcsoportok kialakításában.
2. Az NO-nak (auxin függő módon) sejsors meghatározó szerepe van lucernában.

Eredményeink tükrében kijelenthető, hogy a nitrogén oxid elősegíti a lucerna protoplasztok auxin-indukált sejtosztódásának aktiválódását és stimulálja az embriogén sejtcsoportok kialakulását. Tudomásunk szerint növényekben ez az első olyan értekezés, mely kísérletekkel alátámasztva igazolja az NO kapcsolatát a sejtosztódás ill. a sejt differenciáció szabályozásával.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapját képező publikációk:

Ötvös, K., Pasternak, T., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szűcs A., Bottka, S., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide is involved in the activation of cell division and somatic embryo formation in alfalfa. *The Plant Journal*.43, 849-860.

Fehér, A., Pasternak, T, **Ötvös, K.**, Miskolczi, P. & Dudits, D.: (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*, Bratislava. 57, 1-5.

Ötvös, K.: (2003) Learning to say NO.... *Acta Biologica Szegediensis*. 47, 49.

Fehér, A., Pasternak, T.P., **Ötvös, K.** and Dudits, D.: (2005) Plant protoplasts: Consequences of lost cell walls In: *Journey of a Single Cell to a Plant*. Eds: Murch, S. Saxena PK, Science Publishers Inc., Enfield NH USA.

Fehér, A. And **Ötvös K.**: (2005-6) The physiology of somatic embryo induction: A stressful start. In: *Advances in Plant Physiology*. Ed: Hemantaranjan, A. Scientific Publishers, Jodhpur, India, In press.

Ötvös, K., Pasternak, T., Miskolczi, P., Szűcs, A., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide in plants: the cell fate regulator. *NATO Monographs*. In press.

Ötvös, K., Pasternak, T., Miskolczi, P., Szűcs, A., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Nitric oxide in plants: the cell fate regulator. On-line: <http://www.biomedcentral.com/meetings> (BMC abstract service).

Egyéb publikációk:

Dorjgotov, D., Szűcs, A., **Ötvös, K.**, Szakonyi, D., Kelemen, Zs., Lendvai, Á.,...,Dudits D, Fehér A: (2003) Specific features of RHO GTPase-dependent signalling in plants. Cell Biology International. 27, 191-192.

Szűcs, A., Dorjgotov, D., **Ötvös, K.**, Fodor, Cs., Domoki, M., Györgyey, J., Kaló, P., Kiss, G.B., Dudits, D. and Fehér, A.: (2005) Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). BBA – Gene Structure and expression (közlés alatt).

NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Fehér Attila kijelentem, hogy az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében, kezdetben a Sejtosztódás és Differenciálódás, majd a Funkcionális Sejtbiológia Csoportban, szakmai irányításommal dolgozó Ötvös Krisztina munkája meghatározó mértékben járult hozzá a következő tudományos közleményekhez:

- Fehér, A., Pasternak, T, **Ötvös, K.**, Miskolczi, P. & Dudits, D.: (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia, Bratislava*, 57/1:5
- Fehér, A., Pasternak, T.P., **Ötvös, K.** and Dudits, D.: (2005) Plant protoplasts: Consequences of lost cell walls In: *Journey of a Single Cell to a Plant*. Eds: Murch, S. Saxena PK, Science Publishers Inc., Enfield NH USA.
- Fehér, A. and **Ötvös K.**: (2005-6) The physiology of somatic embryo induction: A stressful start. In: *Advances in Plant Physiology*. Ed: Hemantaranjan, A. Scientific Publishers, Jodhpur, India, In press.

Kijelentem továbbá, hogy ezen közleményeket Ötvös Krisztina felhasználhatja doktori (Ph.D.) fokozatszerzéshez.

Dr. Fehér Attila
Témavezető

Szeged, 2006-01-11