

Doktori értekezés tézisei

***Az Arabidopsis E2FB* transzkripciós faktor funkcionális
jellemzése**

Őszi Erika

Témavezető: Dr. Magyar Zoltán

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport

és

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biológia Doktori

Iskola

Szeged

2020

PUBLIKÁCIÓK

MTMT azonosító: 10063036

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impakt faktora: 12,031

Az összes közlemény kumulatív impakt faktora: 24,140

A disszertáció alapját képző közlemények:

1. **Ószi E**, Papdi C, Mohammed B, Pettkó-Szandtner A, Leviczky T, Molnár E, Galvan-Ampudia C, Khan S, Juez EL, Horvath B, Bögre L, Magyar Z (2020) E2FB Interacts with RETINOBLASTOMA RELATED and Regulates Cell Proliferation during Leaf Development. *Plant Physiology* 182(1):518-53
Q1 IF: 6,420
2. Leviczky T, Molnár E, Papdi C, **Ószi E**, Horváth GV, Vizler C, Nagy V, Pauk J, Bögre L, Magyar Z (2019) E2FA and E2FB transcription factors coordinate cell proliferation with seed maturation. *Development*. 26;146(22)
Q1 IF: 5,611
3. **Ószi E** (2016) A növényi Retinoblasztoma (RB) és az E2FB által szabályozott fejlődési folyamatok tanulmányozása transzgenikus *Arabidopsis* növényekben. PEME XIII. PhD. - Konferencia ISBN: 978-615-5709-00-5, 81-86

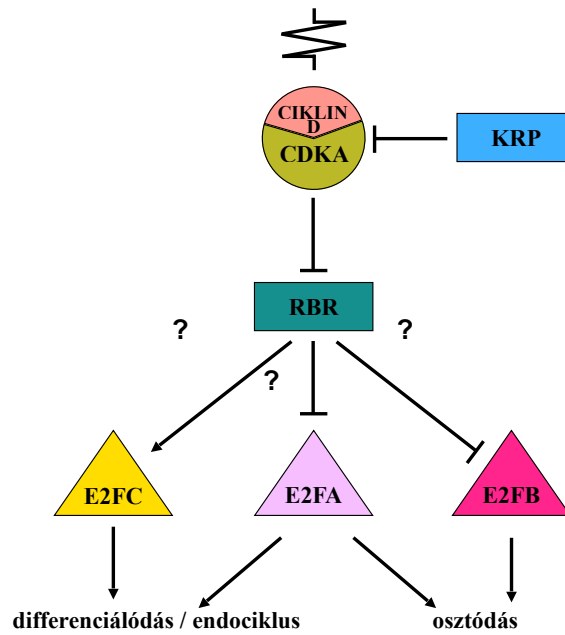
Egyéb közlemények:

1. Natan E, Endoh T, Haim-Vilmovsky L, Flock T, Chalancon G, Hopper JTS, Kintses B, Horvath P, Daruka L, Fekete G, Pál C, Papp B, **Ószi E**, Magyar Z, Marsh JA, Elcock AH, Babu MM, Robinson CV, Sugimoto N, Teichmann SA (2018) Cotranslational protein assembly imposes evolutionary constraints on homomeric proteins. *Nature structural and molecular biology* 25(3):279-288
Q1 IF: 12,109

BEVEZETÉS

Napjainkban a növénybiológiai és mezőgazdasági kutatások komoly kihívások elé néznek. A globális felmelegedés kedvezőtlen éghajlati változásokhoz vezet, amely megnehezíti a mezőgazdasági termelést, miközben az emberiség létszáma folyamatosan gyarapszik, és a termőterületek nagysága tovább már nem növelhető. Olyan megoldásokra van szükség, amelyekkel képesek leszünk a termelés maximalizálására. Ennek kulcsa a növényi növekedést és fejlődést szabályozó molekuláris folyamatok megértése. A növények fejlődése, növekedése és új szerveik kialakulása döntően a sejtosztódás szabályozásán alapszik, amelyet mind a fejlődés-genetikai program, mind a környezeti változások befolyásolnak. A fejlődő növényekben az osztódások helye és ideje komplex szabályozási mechanizmusok ellenőrzése alatt áll, ezek pontos működése azonban még nem teljesen ismert. Az osztódások szabályozásában meghatározó szerepet játszanak a növényi hormonok, különösen az auxin, amely koncentrációfüggő módon képes befolyásolni az osztódás aktivitását. Az osztódásba történő be- és kilépést egy evolúciósan konzerválódott transzkripcionális mechanizmus szabályozza, amit a benne részt vevő komponensekről E2F-RB szabályozásnak nevezünk. A *Retinoblasztoma (RB)* az első olyan, rákos sejtburjánzást gátló gén, amelyet emlős sejtekből izoláltak, míg az E2F (adenovírus E2 faktor) transzkripciós faktort az RB-vel komplexet formáló képessége alapján azonosították. A növények és állatok életmódjának és fejlődésének nyilvánvaló különbözősége ellenére ez a szabályozási mechanizmus meglepően jól konzerválódott (1. ábra). A növényi molekuláris fejlődésbiológiai kutatások modellnövénye, az *Arabidopsis* egyetlen RB-rokon molekulával rendelkezik (RETINOBLASZTOMAROKON, röviden RBR), ami az E2F transzkripciós faktorokon keresztül szabályozza a sejtek osztódását. Központi szerepet játszik ebben a szabályozásban a három *Arabidopsis* E2F transzkripciós faktor (E2FA, E2FB és E2FC). Az alapmodell szerint az E2FB transzkripciós aktivátorként serkenti a sejtosztódásba lépéshez szükséges gének működését, míg az RBR az E2FB-vel komplexet formálva gátolja annak funkcióit (1. ábra). A legújabb eredmények fényében ez az egyszerű modell sokkal komplexebbé vált. A különböző E2F-ek nemcsak egymással átfedő, hanem különböző, egyedi funkciókat is betöltenek. Ezen felül az E2F-ek szövet- és szervspecifikus funkcióval is rendelkezhetnek. Az E2F transzkripciós faktorok működésének mélyebb megismerése közelebb visz bennünket a növekedés és fejlődés hátterében meghúzódó szabályozási folyamatok megértéséhez, amely a közeljövőben a gazdaságilag hasznos növények nemesítési programjai számára kínálhat új lehetőséget.

Növekedési szignálok: auxin, citokinin, abszcizinsav, fény, tápanyagok, ásványi anyagok



1. ábra. Az *Arabidopsis* E2F-RBR szabályozási modell

Növekedést stimuláló körülmények között, tápanyaggazdag környezetben és növekedést serkentő növényi hormonok – auxin és kinetin – jelenlétében aktiválódik az RBR-kináz, (CIKLIN D - CDKA) és a sejtek belépnek az osztódásba. Növekedést gátló körülmények között, tápanyag és fény hiányában, illetve gátló hormonok jelenlétében, – mint amilyen pl. az abszcizinsav (ABA) – az RBR-kináz a CDK inhibitorok (KRP) miatt inaktív marad. Az aktiválódott CIKLIN D - CDK foszforilálja az RBR-t, amely ebben a formájában nem képes kötni az aktivátor E2F transzkripciós faktorokat (E2FA és E2FB). Az *Arabidopsis* egyetlen RB-rokon fehérjéje (RBR) mind a három E2F transzkripciós faktoralal képes komplexet alkotni, de a különböző E2F-RBR komplexek szerepe még nem igazán tisztázott (ezt jelzik a kérdőjelek).

CÉLKITŰZÉSEK

1) Az E2FB osztódásban és differenciálódásban betöltött szerepének meghatározására *Arabidopsis* növények első levélpárját használtuk modellként, amelynek fejlődése alaposan jellemzett és jól nyomon követhető. A következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

- Mi a fejlődő levélben az E2FB szerepe a sejtosztódás aktiválásában és leállításában?
- Hogyan változnak meg a levél bőrszöveti sejtek kvantitatív jellemzői a fejlődő levélben, ha növeljük vagy csökkentjük az E2FB mennyiségét és/vagy aktivitását?
- Az RBR és a CYCD3;1 az E2FB elsődleges szabályozói, és egyben potenciális E2F célgének is. Képes-e az E2FB közvetlenül szabályozni ezeket a géneket az E2F kötőhelyeiken keresztül, ha pedig igen, mi a szabályozási szerepe?
- A levélfejlődés során mi jellemzi az E2FB-RBR fehérje komplex kialakulását, és hogyan változik ez a komplex, ha az E2FB fehérje mennyiségét többszörösére emeljük?
- Hogyan változik az RBR foszforilációja a levélfejlődés során?
- Mi a hatása egy olyan E2FB mutánsnak a levélfejlődésre, amely elveszítette aktivációs és RBR-kötő képességét, de továbbra is képes célgénekhez kötődni?

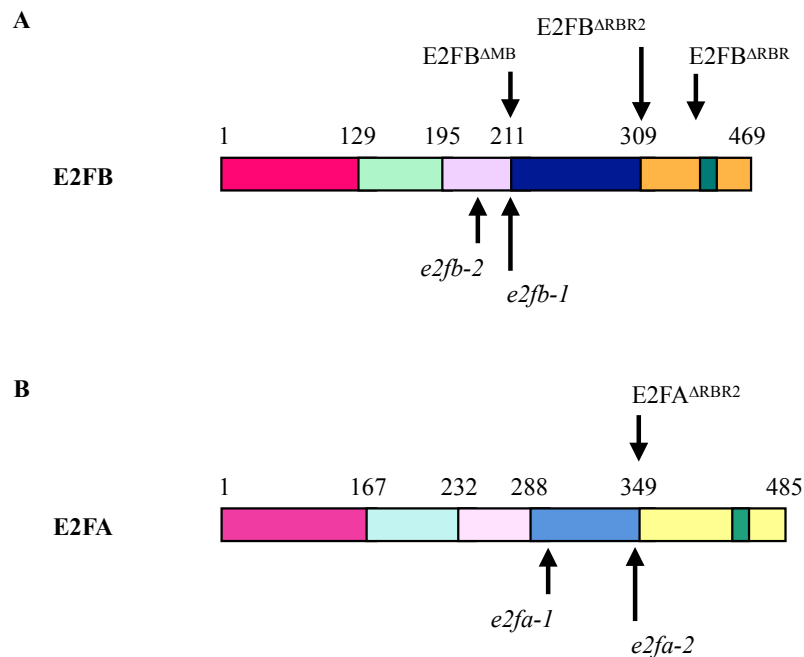
2) Az RBR funkciót specifikusan, az E2FB saját expressziós doménjében, egy mesterségesen előállított mikroRNS-sel próbáltuk gátolni (pE2FB::amiRBR), annak érdekében, hogy az E2FB-t felszabadítsuk az RBR gátlása alól. Azonosítottunk egy olyan transzgenikus vonalat, ahol az RBR csendesítésére jellemző fenotípus mellett megjelentek új makroszkopias elváltozások is, és tanulmányoztam a fenotípus mögötti molekuláris változásokat.

3) Az E2FB transzkripciós faktort a levélsejtekben nemcsak a sejtmagban detektáltuk, hanem a plazmamembránhoz kapcsolódva is. Ezt a megfigyelésünket további kísérletekkel is megpróbáltam igazolni. Mi lehet a szerepe az E2FB-nek a plazmamembránban? Vannak-e az E2FB fehérjének membránspecifikus kölcsönható partnerei? Mik ezek, és vajon az E2FB befolyásolja-e ezeknek a membrán komponenseknek a működését?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

1. Plazmid konstrukciók és transzgenikus növények létrehozása:

- Fluoreszcens taggel jelölt E2F transzlációs konstrukciók: pgE2FB-GFP, pgE2FA-GFP, pgE2FB-3xvYFP, pgE2FA-3xvYFP
- E2FB-t és DPA-t együttesen túltermelő transzgenikus vonal: p35S:HA-E2FB-DPA^{OE}
- Deléciók E2F konstrukciók: HA-E2FB^{ARBR}/DPA, GFP-E2FA^{ARBR2}, GFP-E2FB^{ARBR2}, E2FB^{AMB} (2. ábra)
- E2F T-DNS inszerciós funkcióvesztéses mutánsok: *e2fb-1* [SALK_103138], *e2fb-2* [SALK_120959], *e2fa-1* [MPIZ-244], *e2fa-2* [GABI-348E09], *e2fab* (*e2fa-2/e2fb-1*) dupla, komplementált *e2fb-2* [pgE2FB-GFP] (2. ábra)



2. ábra. A dolgozatban felhasznált E2FB és E2FA konstrukciók

Az **A**) E2FB és **B**) E2FA konstrukciók domén szerveződése. A különböző színek az eltérő doméneket jelölik. Ciklámen = N-terminális régió, menta zöld = DNS-kötő domén, rózsaszín = dimerizációs domén, kék = marked box, sárga = transzaktivációs domén, zöldeskék = RBR kötő domén. Az általunk használt T-DNS inszerciós *e2fa* és *e2fb* mutáns vonalakban (dőlt betűvel szedve) nyilak jelölik a beépülés helyét az E2F fehérjékbe, míg a deléciók esetében (Δ -val jelölve) nyilak mutatják, hol kezdődik a deléció.

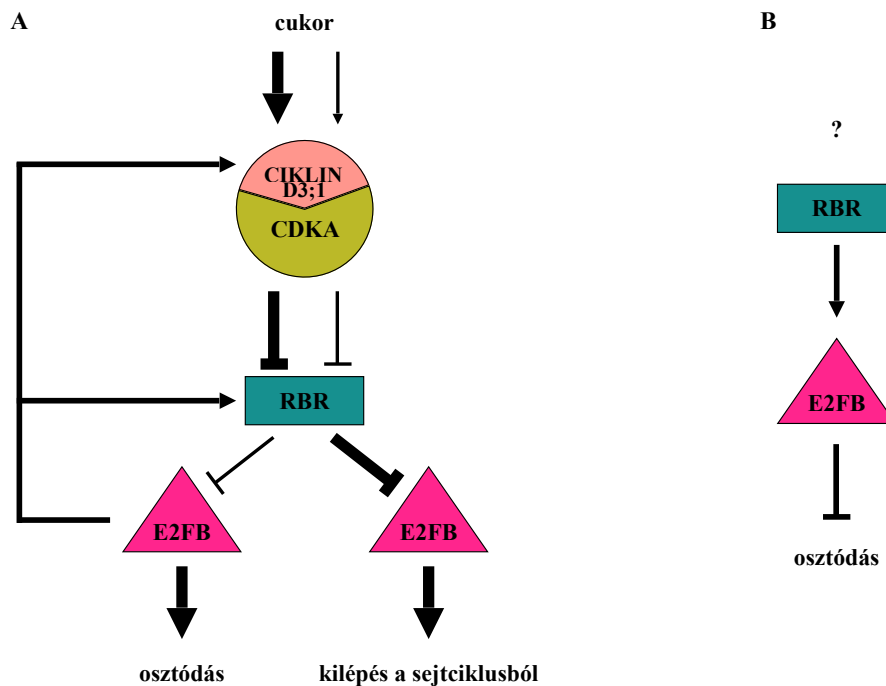
- E2F promóterek által irányított mesterséges mikroRNS-sel transzformált konstrukciók, ahol az E2F-et expresszáló sejtekben gátlódott az RBR fehérje: pE2FC::amiRBR, pE2FB::amiRBR
- PIN3 konstrukciók: pgPIN3-GFP, 35S::PIN3-RFP

2. *Arabidopsis thaliana* növények transzformációja virág merítéses agroinfiltráció módszerével
3. *Nicotiana benthamiana* növényi levelek agroinfiltrációja
4. Mikroszkópos analízis:
 - levél agaróz lenyomat készítés
 - gyökércsúcs lugol festése
 - gyökerek EdU (5-Etinil-2-DeoxiUridin) festése
 - különböző fluoreszcens tagek konfokális lézermikroszkópos vizsgálata
5. A levél kinematikai jellemzése: sejtméret, cirkularitás, sejtszám/levél, zárósejt index, zárósejtszám/levél, epidermális sejtszám/levél, extra sejtosztódások/levél
6. Áramlási citometria a sejtek DNS tartalmának meghatározására
7. Immunoblott analízis
8. Immunoprecipitálás
9. *In vitro* hiszton H1 kináz aktivitási teszt
10. Membrán preparáció differenciál centrifugálással
11. Kromatin immunoprecipitáció
12. Reverz transzkripció kvantitatív PCR (RT-qPCR)
13. Termikus aszimmetrikus átfedő PCR (TAIL-PCR)
14. Gyökér gravitációs teszt
15. Agroinfiltrált *Nicotiana* dohánylevél és transzgenikus *Arabidopsis* növények auxin efflux vizsgálata levél protoplaszt sejtekben

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Kimutattuk, hogy a levél fejlődése során az E2FB az RBR szigorú ellenőrzése alatt áll. Az E2FB saját expressziós doménjében történő túltermeltetése az RBR fehérje szintben is hasonló mértékű emelkedéshez vezetett. Az RBR az E2FB-vel komplexbe lépve megakadályozza a sejtosztódás hiperaktiválódását, és egyben a fiatal levélsejtek osztódását is. Ennek köszönhetően a hasonló korú kontroll növények leveléhez képest csökkent a sejtszám az E2FB-túltermelő növények levelében.
- 2) Kimutattuk, hogy az E2FB közvetlenül nemcsak az *RBR* gén kifejeződését képes aktiválni, hanem az RBR-kináz szabályozó alegységét, a *CIKLIND3;1*-et is. Ez a pozitív visszacsatolási mechanizmus az RBR foszforilációján keresztül képes gátolni az RBR működését. Ezek a visszacsatolási hurkok az E2FB-RBR-CYCD3;1 között fontos szerepet játszhatnak a levél fejlődése során a sejtosztódás és a differenciálódás közti egyensúly kialakításában (3. ábra A).
- 3) Domináns negatív E2FB mutáns ($E2FB^{ARBR}$ -DPA) növények levélfejlődésének a jellemzésén keresztül kimutattuk, hogy az E2FB a zárósejtek kialakulásáért felelős levél merisztémoidokban represszor komplexet formál az RBR fehérjével és ennek hiányában megnő a merisztémoid sejtek száma. Mindez arra enged következtetni, hogy az E2FB szerepe a levél sejttypusától függően lehet aktivátor vagy represszor (3. ábra B).
- 4) Kimutattuk, hogy a megemelt E2FB szint a már megnyúlt levél bőrszöveti sejtekben indukálta az osztódásba történő ismételt belépést. Az osztódást követő levélfejlődési stádiumban az RBR az E2FB gátlásán keresztül biztosítja a nyugalmi állapotot a differenciálódás irányába elkötelezett levélsejtekben. Mindezek alapján az E2FB a levél fejlődési állapotától függően lehet aktivátor és represszor is a levélsejtekben (3. ábra A).
- 5) Kimutattuk, hogy az E2FB hiányában a sejtciklus gének aktivitása csökken, de fehérje szinten már nem detektáltunk változást. Mindez kompenzációs folyamatokra enged következtetni. Kimutattuk, hogy az E2FA fehérje szint az *e2fb* mutánsokban megnő, és fordítva az E2FB szint is megemelkedik az *e2fa* mutánsokban. Az E2FA nem kötődik az E2FB specifikus célgénekhez (pl. CDKB1;1), és nem hat kölcsön az E2FB-re jellemző specifikus fehérje partnerekkel sem. A két aktivátor E2F az RBR fehérje működésére ellentétesen hat; az

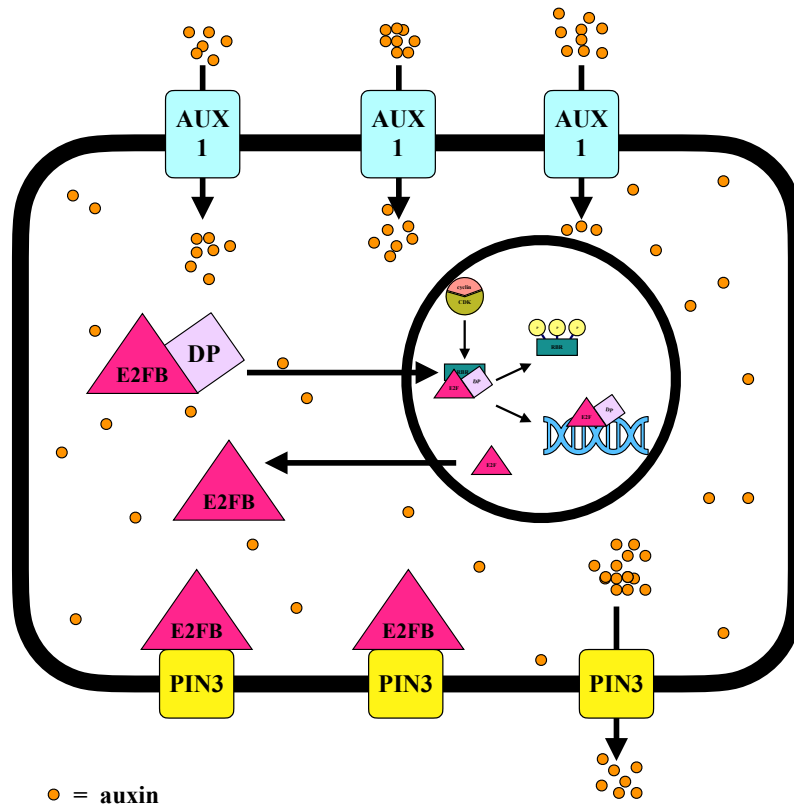
E2FA gátolja, míg az E2FB serkenti az RBR foszforilációját. Feltételezzük, hogy az E2FA és az E2FB alternatív útvonalakon képes a sejtosztódást szabályozni.



3. ábra. Az E2FB funkcióit leíró szabályozási modell a levélfejlődés során

Az E2FB három eltérő aktivitással rendelkezik; **A)** ezek különböző levél fejlődési szakaszokban vagy **B)** különböző sejt típusokban dominálnak. **A)** A fiatal levelekben az aktív E2FB (RBR-szabad forma) osztódó levélsejtekben képződik. A fiatal, még osztódó levél tápanyagokban gazdag szövet, ahol az E2FB felszabadul az RBR gátlása alól a CIKLIN D3;1 - CDKA kináz által, amely cukor hatására aktiválódik és foszforilálja az RBR-t (bal oldali út vonal). Az aktív E2FB visszacsatolási mechanizmusok révén aktiválja a saját szabályozói, az RBR és a CIKLIN D3;1 expresszióját egyaránt. Ez az autoregulációs szabályozás stabilizálja a rendszert. Azokban a növényi sejtekben, ahol a növekedési szignál gyengébb (jobb oldali út vonal), az E2FB és az RBR szint egyaránt csökken, és az RBR aktívabbá válik (kevésbé foszforilálódik), ami az E2FB kötéséhez és gátlásához vezet. Ez a gátlás fontos szerepet játszik a nyugalmi állapot kialakulásában a differenciálódás irányába elkötelezett levélsejtekben. **B)** A fejlődő levelekben az E2FB represszor komplexet képez az RBR-rel a zárósejt merisztémoidokban, és kontrollálja az osztódásukat. Nem ismerjük azonban, hogy hogyan, milyen szignálok által szabályozódik ez az út vonal.

6) A fejlődő levélben az E2FB fehérjét gyakorlatilag minden levélsejtben ki tudtuk mutatni, legyen az osztódó, merisztematikus, vagy terminálisan differenciálódó. A meghatározó sejt magi lokalizáció mellett kimutattuk, hogy az E2FB fehérje a membránhoz kapcsolódva is detektálható. Felfedeztük, hogy kölcsönhat membránspecifikus fehérjékkel, mint az auxin transzportban szerepet játszó auxin efflux PIN3 és PIN7 fehérjék. Kezdeti eredményeink arra engednek következtetni, hogy az E2FB a PIN3 fehérjével komplexben gátolja annak működését, és így képes lehet befolyásolni az auxin áramlását és sejtben belüli koncentrációját (4. ábra).



4. ábra. Az E2FB szerepe az auxin transzport szabályozásában

Az auxin aktiválja a sejtosztódást, feltehetően az RBR-kináz aktiválásán keresztül (CIKLIND3;1-CDKA;1). A CDK által foszforilált RBR szabadon engedi az E2FB-t, ami aktiválja a sejtciklus géneket. A modell feltételezi, hogy a CDK foszforiláció révén az S-fázist követően inaktiválja a DP partnert is. Az E2FB monomer, DP nélküli formája kiáramlik a sejtmagból és a PIN3 auxin efflux csatornához kötődik a plazmamembránban, megakadályozva ezzel az auxin kiáramlását a sejtől, aminek köszönhetően a sejtben belüli auxin szint tovább emelkedik. A megnövekedett auxin szint serkentheti a DP fehérjék szintézisét, és a DPA E2FB-hez történő dimerizációját. A DP dimerizáció csökkenti az E2FB sejtmagon kívüli mennyiségét. Az E2FB szint emelkedése az RBR szint emelkedéséhez is vezet, aminek köszönhetően gátlódhat a sejtosztódás, és az E2FB fehérje aktivitása is, ami az auxin szint csökkenéséhez vezet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak, és kifejezzem hálámat mindazoknak, akik munkámban segítettek és mellettem álltak az évek során.

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Magyar Zoltánnak, laboratóriumunk vezetőjének, aki szakmai előmeneteletem az elmúlt 8 évben támogatta és tanácsaival segítette. Áldozatos munkája, rugalmassága és naprakészsége nélkül nem születhetett volna meg ez a dolgozat.

Szeretném külön megköszönni Dr. Molnár Eszternek, hogy egyszerre volt barát és munkatárs. Hasznos tanácsaival és szakértelmével nagymértékben hozzásegített a molekuláris módszerek elsajátításához és kreatív ötleteivel a legösszetettebb feladatot is képesek voltunk megoldani.

Hálás vagyok Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak, aki MS analíziseivel segítette az E2FB-kölcsönható partnerek feltérképezését, ezáltal az E2FB funkcióinak mélyebb megismerését.

Köszönetet szeretnék mondani Vaskó-Leviczky Tündének, aki színvonalas munkájával és hozzájárulásával segített, hogy a dolgozat teljessé váljon.

Hálával gondolok a Növényi Morfogenezis Szabályozása csoport valamennyi tagjára, akik mindig vidám, gondtalan légkört teremtettek, és kérdéseimmel, kéréseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Hálás vagyok Dr. Rigó Gábornak, akihez bármikor bátran fordulhattam tanácsért, és aki nem egyszer segített ki a kísérletekhez szükséges anyagokkal is.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Koncz Csabának és Dr. Koncz Zsuzsának (Max Planck Intézet, Köln) a támogatását, és a lehetőséget, hogy pályám egy igen fontos időszakát náluk tölthettem. Meghatározó élmény volt számomra.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Markus Geislernek is (Fribourgi Egyetem, Svájc), hogy lehetőséget biztosított számomra a laboratóriumában, ahol új technikákat sajátíthattam el. Ennek köszönhetően fedezhettem fel, hogy az E2FB fontos szerepet játszhat az auxin transzportjában is. Ez a rövid, néhány hónapos időszak nagyon izgalmas szakasza volt az életemnek, amiért nagyon hálás vagyok neki és csoportjának egyaránt.

Itt szeretném megköszönni a segítséget a velünk együttműködő csoportoknak, elsősorban az angliai Royal Holloway Egyetem School of Biological Sciences-ben dolgozó Dr. Horváth Beatrixnak, Prof. Dr. Bögre Lászlónak, és különös tekintettel Dr. Papdi Csabának, aki a kromatin immunoprecipitációt végezte.

Hálás vagyok szüleimnek és családomnak, akik mindvégig maximálisan támogattak, és biztosították a gondtalan egyetemi éveket.

Köszönöm barátaimnak, hogy annyi emlékezetes pillanatot szereztek az elmúlt évek folyamán, amikre mindig vidáman gondolhatok vissza, ezzel is élvezetesebbé téve az egyetemi éveket.

Köszönöm a támogatást barátomnak, aki ösztönzésével és szövegszerkesztési bravúrjaival elősegítette a dolgozat megszületését.

Munkámat a következő pályázatok támogatták:

- Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal OTKA K-105816-os pályázata
- Gazdaságfejlesztési és innovációs operatív program GINOP-2.3.2-15-2016-00001 pályázata
- Campus Mundi SM-SMP-KA107/907/2019 számú pályázata
- Nemzeti Tehetség Program NTP-EFÖ-P-15-0392 pályázata
- Campus Hungary B2/1SZ/4176-es számú pályázata