



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola



Doktori értekezés tézisei

A növényi (Arabidopsis) aktivátor E2F transzkripciós faktorok szerepe a magfejlődésben és a sejtciklus szabályozásában

Vaskó-Leviczky Tünde

Témavezető: Dr. Magyar Zoltán

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport

Szeged

2020

BEVEZETÉS

A növényi növekedést meghatározó molekuláris szabályozó rendszerek megismerése a növénybiológia jelenleg is intenzíven kutatott területe, megértésük nemcsak tudományos, hanem gyakorlati szempontból is korunk egyik legizgalmasabb növénybiológiai problémája. A fejlődő növényekben a sejtciklus alatt a sejtosztódási gének koordinált működését a jelenleg elfogadott modell szerint egy az evolúció során konzerválódott transzkripcionális mechanizmus irányítja, melyet a benne résztvevő szabályozó elemekről E2F-RB-nek neveztek el, amely elsősorban a sejtosztódási gének be és kikapcsolásában vesz részt (Magyar és mtsai., 2008). Arabidopsisban egyetlen RB rokon fehérjét azonosítottak (RBR), amely három E2F transzkripciós faktorról (E2FA, E2FB, E2FC) képes komplexet alkotni (Magyar és mtsai., 2016). Az E2FA és az E2FB transzkripciós faktorok túltermeltetése növeli az osztódások számát, míg az E2FC esetében a túltermeltetés gátolja a sejtosztódást a posztembrionális fejlődés során. Ezek alapján az E2FA és E2FB transzkripciós faktorokat aktivátornak, az E2FC-t represszor típusúnak tekintjük (De Veylder és mtsai., 2002; del Pozo és mtsai., 2006; Magyar és mtsai., 2005; Magyar és mtsai., 2012; Sozzani és mtsai., 2006). A növényi sejtosztódás az embrió fejlődése során is egy szigorúan szabályozott folyamat, ahol az osztódások irányítottan, egy meghatározott „koreográfia” szerint valósulnak meg. Az embriógenézis során a sejtosztódási és az érési gének koordináltan fejeződnek ki, de nem igazán ismert még, hogy a fejlődő magban pontosan mi hangolja össze ezeket a folyamatokat.

A növényi magfejlődés két, egymást követő szakaszra osztható; az első a morfogenezis, amelyben a sejtosztódás a fő esemény, a második a mag érési fázisa, melyben az embrió eléri végső méretét és ahol a tartalék tápanyagok felhalmozódnak (Holdsworth és mtsai., 2008; Lau és mtsai., 2012; Sun és mtsai., 2010). Az embriógenézis utolsó lépése a szárazság tolerálására való képesség megszerzése és a magnyugalmi állapot kialakulása (Devic és Roscoe, 2016). Mezőgazdasági szempontból ezek mind igen fontos folyamatok, amelyek meghatározzák a képződő magok minőségét. A mag érésének genetikai szabályozásában a LEC1 és három egymással rokon B3 típusú TF, a LEC2, a FUS3 és az ABI3 játszanak kulcsszerepet (Lotan és mtsai., 1988; Stone és mtsai., 2001; Luerssen és mtsai., 1988; Giraudat és mtsai., 1992). Míg a B3 TF-ok együttesen aktiválják a tartalékfehérje gének expresszióját (Kroj és mtsai., 2003), addig a LEC2 TF szabályozza a WRI1 TF kifejeződését is, melynek célgénjei a zsírsavszintézisben szerepet játszó gének (Baud és mtsai., 2007).

Az eukarióta sejtosztódás szabályozásának legújabb felfedezése a DREAM, amely egy több komponensből álló fehérje komplex. Ezt a transzkripciós faktorokat magába foglaló fehérje komplexet az állati modell élőlényekben mutatták ki először és összetétele a különböző állati fajok ellenére, meglepően hasonlóknak bizonyult. Funkcionális jellemzése során megállapították, hogy elsődleges funkciója a represszió: differenciálódási géneket kapcsol ki osztódó sejtekben, és megakadályozza, hogy a korai illetve késői sejtciklus gének rosszkor, pontatlanul működjenek a sejtciklus során (Sadasivam és deCaprio, 2013). A növényekben számos olyan transzkripciós faktor megtalálható, amely növényi megfelelője az állati DREAM komplex komponenseinek, de DREAM komplexet eddig nem azonosítottak növényekben.

Nemcsak tudományos, hanem mezőgazdasági szempontból is fontos megérteni, hogyan szabályozódik a magfejlődés. Különösen időszerű ez napjainkban, amikor a folyamatosan növekvő lélekszám és a kedvezőtlen éghajlati változások mellett kellene fokozni a terméshozamot. Az E2F-RBR szabályozás elsősorban, mint a sejtosztódási gének „kapcsolója” van elkönyvelve, és kevésbé ismert, hogy más folyamatok, és gének működését is irányíthatja. Eredményeink alapján az E2F-RBR egy olyan koordinációs mechanizmus központi eleme, amely a fejlődő magban elsősorban az osztódási és az érési folyamatok összehangolásában játszik meghatározó szerepet, míg meglepő módon a sejtosztódást aktiváló funkciója kevésbé hangsúlyos. Sikerült ugyanakkor kimutatnunk az állati DREAM komplexekkel hasonló összetételű növényi fehérje komplexek jelenlétét, amelyek növény-specifikus tulajdonságokkal is rendelkeznek.

Az E2F-RBR szabályozás jobb megértése és megismerése azzal a lehetőséggel kecsegtet, hogy a mezőgazdaságilag fontos növényekben is javítani, fokozni lehet a magok minőségét és a terméshozamot.

CÉLKITŰZÉSEK

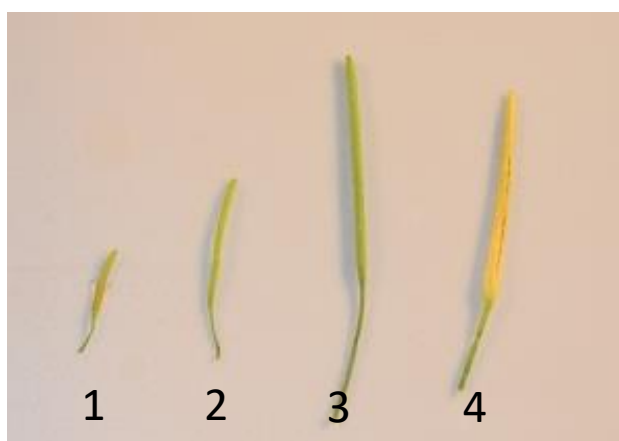
1. Jellemezzük az aktivátor E2F transzkripciós faktorokat (E2FA és E2FB) a mag és az embrió fejlődése során. Mennyire egyediek és mennyire átfedőek a funkcióik? Egymáshoz képest hogyan fejeződnek ki a fejlődő becőben és magban mRNS és fehérje szinten, és mi jellemző a fehérje megoszlásukra a fejlődő embrióban?
2. Milyen szabályozó szerepet játszanak az aktivátor E2F transzkripciós faktorok a mag és az embrió fejlődése során különös tekintettel a sejtosztódás szabályozására? Hogyan változik meg a sejtosztódási gének kifejeződése az aktivátor *e2fa-2*, *e2fb-1* szimpla és az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns magokban és becőkben? Hogyan változik meg az embrió és az embrionális szervek mérete és hogyan alakul a sejtszám és sejtméret az *e2f* mutáns embriókban?
3. A mag érési gégeiben (*LEC2* és *WR11*) kimutatható E2F-kötő szekvencia, ami alapján feltételezhető az E2F transzkripciós faktorok szabályozó szerepe. Megvizsgáljuk vajon az E2F faktorok szabályoznak-e más, nem sejtciklus géneket is a fejlődő magban és becőben, és ha igen, akkor ez milyen hatással van a fejlődő embrióra és magra?
4. Az állati E2F fehérjét többkomponensű ún. DREAM fehérje komplexben mutatták ki, melyek elsődleges funkciója a represszió. Megvizsgáljuk a növényekben is található-e az állatihoz hasonló összetételű DREAM komplex? Vajon a növényi E2F-ek milyen fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba?
5. Az E2FB az Arabidopsis egyik legközelebbi rokonában, a repcében (*Brassica napus*) is megtalálható. Mennyiben hasonlít a repce E2FB az Arabidopsis rokonához? Vajon a repce *E2FB* gége az Arabidopsisban hasonló gyökér kifejeződést mutat az Arabidopsis saját, endogén E2FB fehérjéjével? Milyen fehérjékkel lép kölcsönhatásba a repce E2FB?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

1. Felhasznált és létrehozott növényi vonalak és a kísérletek során felhasznált becők méret szerinti csoportosítása

Felhasznált Arabidopsis, Brassica, Arabidopsis transzformáns és Arabidopsis mutáns vonalak
<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia (Col-0)
<i>Brassica napus</i> cv. Westar
pgE2FA-vYFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgE2FB-vYFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgRBR-CFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgE2FA-GFP (Magyar és mtsai., 2012)
pgE2FB-GFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgMYB3R3-GFP (Kobayashi és mtsai., 2015)
pgMYB3R4-GFP (Kobayashi és mtsai., 2015)
<i>e2fa-1</i> : MPIZ-244 (Berckmans és mtsai., 2011b)
<i>e2fa-2</i> : GABI-348E09 (Berckmans és mtsai., 2011b)
<i>e2fb-1</i> : SALK_103138 (Berckmans és mtsai., 2011a,b)
<i>e2fb-2</i> : SALK_120959 (Horváth és mtsai., 2017)
<i>e2fa-2/e2fb-1</i> (Heyman és mtsai., 2011)
Munkánk során előállított Arabidopsis transzformáns vonalak
pWRI1-CFP
p ^{mutE2F} WRI1-CFP
pLEC2-CFP
p ^{mutE2F} LEC2-CFP
pgBrE2FB-vYFP

1. táblázat: Felhasznált és létrehozott Arabidopsis és Brassica növényi vonalak jegyzéke.



Becőstádium	Beporzás utáni napok
	száma
1.	2-3
2.	4-7
3.	8-12
4.	13-17

1. ábra: Különböző fejlődési stádiumú becő minták, melyek a különböző magfejlődési állapotokat mutatják be.

Az első korai fejlődési stádiumba tartozó becőket (morfogenetikus, osztódó becők és magok) pár nappal a megtermékenyítést követően, néhány milliméteres hosszúságnál gyűjtöttük be. A második fejlődési stádium becőit 0,4-0,6 cm méretnél gyűjtöttük be (átmeneti fázis a morfogenikus szakasz és az érési szakasz között). A harmadik stádium becői zöld színűek és elérték a végleges méretüket (érési fázisú becők). A 4. stádium becőinek mérete a 3. stádiumú becők méretéhez hasonló, de sárga színűek (érés utáni nyugalmi fázisú becők). A beporzás utáni napok számát a táblázat jobb oldalán jelöltük.

2. Plazmid konstrukciók létrehozása (pWRI1-CFP; p^{mutE2F}WRI1-CFP; pLEC2-CFP; p^{mutE2F}LEC2-CFP; pgBrE2FB-vYFP)

2.1. Genomi DNS tisztítása CTAB extrakciós módszer a segítségével

2.2. Genomi klónok létrehozása *Phusion* DNS polimeráz segítségével

2.3. PCR termékek tisztítása poetilén-glikollal (PEG)

2.4. Klónozás GatewayTM (Invitrogen) módszerrel, homológ rekombináció segítségével

2.5. BP klónozási reakció

2.6. LR klónozási reakció

2.7. Hely specifikus mutációk létrehozása, a Quick change mutagenézis módszerével

3. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása E. coli (XL-1 Blue) kompetens sejtben

4. A szelektált bakteriális klónok további ellenőrzése kolónia PCR segítségével
5. Plazmid izolálása bakteriális tenyészetekből
6. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása *Agrobacterium tumefaciens* (pSoupAgricola/GV3101) sejtekben
7. *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformáció, a transzformált *Arabidopsis* növények antibiotikumon történő szelekciója
8. Western immunoblot analízis
9. Fehérje komplexek tisztítása immunológiai eljárással (ko-immunoprecipitálás vagy Co-IP)
10. RNS tisztítás CTAB-LiCl extrakciós módszerrel, cDNS írás és kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)
11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)
12. Fehérjék tömegspektrometriás analízise
13. Embriópreparálás, mikroszkópos vizsgálatok

EREDMÉNYEK

1, Az aktivátor E2FA és E2FB szimpla és dupla mutánsok érett embrióiban a sejtszám a kontrollhoz képest nem változik meg. A fejlődő embrióban a két aktivátor E2F funkciójára ugyan szükség van a sejtciklus szabályozó gének teljes, maximális kifejeződéséhez, de a csökkent expresszió ellenére a sejtosztódásban nem láttunk lényeges különbséget a kontrollhoz képest. Ezek alapján, az embriogenezis során az aktivátor E2F-ek nem esszenciális komponensei a sejtosztódba lépésnek.

2, Az aktivátor E2F-ek a sejtciklus gének represszoraiként működnek a mag nyugalmi fejlődési szakaszában. Feltételezzük, hogy mindkét E2F az RBR fehérjével hoz létre represszor komplexet és ez az E2FC-vel kiegészülve fontos szerepet játszhat a mag nyugalmi állapotának a kialakításában. Láttunk némi eltérést is az E2FA és az E2FB működése között: mindkettő gátolja az S fázis specifikus szabályozó gének kifejeződését, míg az M fázis specifikus *CDKB1;1* expresszióját egymással ellentétesen szabályozzák; az E2FA gátolja, míg az E2FB aktiválja a gén kifejeződését.

3, Szemben az E2FA-val és az RBR-vel az E2FB transzkriptum és fehérje a kiszáradt, nyugvó magban is detektálható. Ez alapján az E2FB RBR-független, egyelőre még nem ismert szabályozó szereppel bírhat ebben a magfejlődési stádiumban.

4, A LEC2 és a WRI1 TF-ok promóterében található E2F kötőhely mutációja ezeknek a géneknek az idő előtti, már a magfejlődés osztódási fázisa során bekövetkező aktivációjához vezet. A kulcsfontosságú magéresi gének, mint a *LEC1-2*, *ABI3*, *FUS3* és *WRI1* expressziója fokozódott az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embrióban. Eredményeink alapján az E2F-ek a magéresi gének negatív szabályozói, de nem csak az osztódó embrióban korlátozzák azok működését, hanem a mag érési fázisa során is képesek befolyásolni az expressziós szintjüket (mintegy beállítják, finoman hangolják a kifejeződésüket).

5, Az E2F TF-ok a *LEC2* gén működését közvetlenül, fejlődési fázisra specifikus módon szabályozhatják. Kimutattuk, hogy az E2FA TF a mag érési fázisa során kötődik a *LEC2* gén promóteréhez, mégpedig az E2F kötőhelyhez specifikusan.

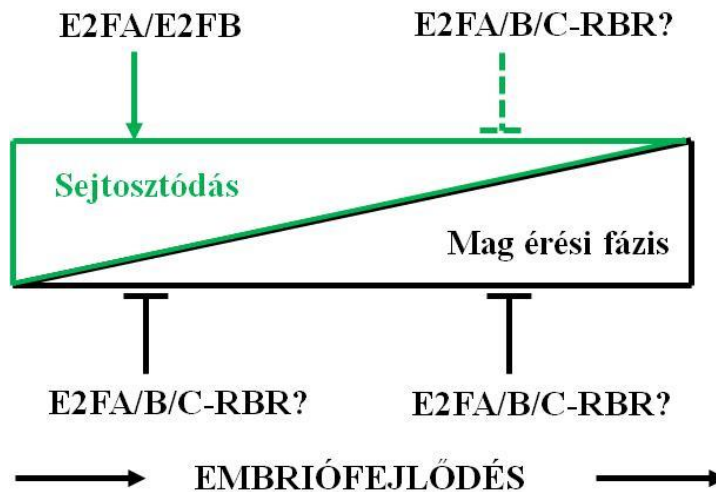
6, A mag legfontosabb tartalék fehérjéi, a 2S albumin és a 12S globulin idő előtt felhalmozódnak, már a magfejlődés osztódási fázisa során az *e2fa* és *e2fb* szimpla és dupla mutánsokban. A különböző funkcióvesztéses *e2fa* és *e2fb* mutánsokban tapasztalt tartalék

fehérje felhalmozódás alapján feltételezzük, hogy az E2F-ek az RBR-rel komplexben megakadályozzák a tartalék fehérjék korai, idő előtti felhalmozódását.

7, Mind a két elsősorban embrionális gén, a *LEC2*, és a *WR11* az *Arabidopsis* gyökérben is kifejeződik, legerősebben a gyökérmerisztéma összejt régióban. Az E2F TF-ok a *WR11* kifejeződését akár csak az embrióban, a gyökérben is gátolják, de a *LEC2* működését a gyökérben az embrióval ellentétesen szabályozzák. Ez alapján az E2F szabályozás egy adott gén esetében a fejlődési stádiumtól függően változhat.

8, Kimutattuk, hogy a növényekben is vannak DREAM jellegű fehérje komplexek, amelyek összetétele hasonló az állati DREAM komplexekhez. Szemben az állatokkal azonban, a növényekben található represszor E2FC mellett, az aktivátor E2FB is részt vesz ilyen típusú komplexek formálásában. A fiatal osztódó levélben az E2FB az aktivátor MYB3R4 fehérjéhez kapcsolódik, míg a már differenciálódó levelekben a represszor E2FC a represszor MYB3R3 fehérjéhez asszociálódik. A MuvB (MIP) központi egység összes eleme megtalálható a növényi DREAM komplexekben.

9, A repce E2FB genomikus klónjával transzgenikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre. A gyökérmerisztémában a repce és az *Arabidopsis* E2FB fehérjék nagyon hasonló expressziós mintázattal rendelkeznek; az E2FB mindkét esetben sejtmagi lokalizációjú és a posztmitotikus sejtekben halmozódik fel nagyobb mennyiségben. Ez alapján az E2FB fontos szerepet játszhat a sejtmeignyulásban és a differenciálódásban is. A repce E2FB fehérje kölcsönhat az RBR, a DPA és DPB fehérjékkel, valamint a DREAM komplex egyik komponensével, az ALY3 fehérjével is. Mindez arra enged következtetni, hogy a repce E2FB az *Arabidopsis* E2FB fehérjéhez hasonló tulajdonságokkal rendelkezik.



2. ábra: Az aktivátor E2F-ek feladatát a mag és az embriófejlődés során bemutató modell.

A mag és embriófejlődést két egymást követő, ellentétesen szabályozott folyamat határozza meg. Az első az osztódási fázis, melynek során létrejönnek az embrióra jellemző szervek és szövetek (morfogenezis), a második a mag érési fázisa, amely során megtörténik a differenciálódás és fő eseménye a tartaléktápanyagok felhalmozódása (zöld és fekete háromszögek). Az aktivátor E2F-ek feladata a morfogenezis során a sejtciklus szabályozó gének teljes mértékű aktiválása, míg az érési fázisban a magnyugalmi állapot megteremtése a sejtosztódás gátlásán keresztül, feltehetően az E2FC-vel együtt és az RBR-el komplexet alkotva. Az aktivátor E2F-ek gátolják a morfogenezis során a mag érési programját. Megakadályozzák a mag érési gének, mint a LEC2 és a mag tartalék fehérjéinek, mint a 2S albumin és a 12S globulin idő előtti felhalmozódását. A magfejlődés differenciálódási fázisa során pedig finoman hangolják a mag érési gének kifejeződését és ebben a szabályozási folyamatban feltehetően az E2FC és az RBR is részt vesz.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Magyar Zoltánnak, hogy a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban, a Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoportban biztosította számomra a támogatást és a helyszínt a munkám elvégzéséhez. Hálával tartozom neki, amiért a csoportban eltöltött évek alatt és azután is ösztönzően és türelmesen kísérte figyelemmel és segítette munkámat. Tudományos és szakmai tanácsai, segítsége a megfelelő irányba tereltek munkám során.

Hálásan köszönöm a csoport egykori és jelenlegi tagjainak, különösen Dr. Molnár Eszternek, Ószi Erikának, Pappné Deli Mártának és Dudásné Kovács Anitának a növények nevelésében, a laboratóriumi munkában és a szakmai kérdésekben nyújtott segítséget, valamint a vidám hangulatú munkanapokat.

Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak köszönettel tartozom a tömegspektrometriás eredményekért, Dr. Papdi Csabának pedig a kromatin-immunoprecipitációban nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, akik támogattak munkám során és megteremtették a dolgozat megírásához szükséges nyugodt családi légkört.

Munkánkat egy OTKA-program (OTKA-K-105816) és egy GINOP támogatás (GINOP-2.3.2-15-2016-00001) finanszírozta. A jelölt munkáját a Magyar Tudományos Akadémia fiatal kutatói ösztöndíjjal támogatta.

PUBLIKÁCIÓK

MTMT azonosító: 10050899

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impakt faktora: 15,254

Az összes közlemény kumulatív impakt faktora: 27,565

A disszertáció alapját képező közlemények:

Leviczky, T., Molnár, E., Papdi, C., Ószi, E., Horváth, G.V., Vizler, C., Nagy, V., Pauk, J., Bögre, L., Magyar, Z. (2019) E2FA and E2FB transcription factors coordinate cell proliferation with seed maturation. Development. 146(22):dev179333. IF: 5,611

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. EMBO J. 34(15):1992-2007. IF: 9,643

Egyéb közlemények:

Ószi, E., Papdi, C., Mohammed, B., Pettkó-Szandtner, A., Leviczky, T., Molnár, E., Galvan-Ampudia, C., Khan, S., Juez, E.L., Horváth, B., Bögre, L., Magyar, Z. (2020) E2FB Interacts with RETINOBLASTOMA RELATED and Regulates Cell Proliferation during Leaf Development. Plant Physiol. 182(1):518-533. IF: 6,420

Benyó, D., Horváth, E., Németh, E., Leviczky, T., Takács, K., Lehotai, N., Feigl, G., Kolbert, Z., Ördög, A., Gallé, R., Csiszár, J., Szabados, L., Erdei, L., Gallé, Á. (2016) Physiological and molecular responses to heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of Populus deltoides and P. x canadensis. J Plant Physiol. 201:62-70. IF: 3,121

Gallé, Á., Csiszár, J., Benyó, D., Laskay, G., Leviczky, T., Erdei, L., Tari, I. (2013) Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress: biosynthesis and function of ABA in stress responses. J Plant Physiol. 170(16):1389-99. IF: 2,770