

A doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Az embriogén kompetencia kialakulása során  
aktiválódó gének azonosítása lucerna sejtekben és  
az “*Oxprot*” gén jellemzése**

**Domoki Mónika**

Témavezető: Dr. Fehér Attila

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Növénybiológiai Intézet  
Funkcionális Sejtbiológia Csoport

Szegedi Tudományegyetem  
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

## BEVEZETÉS

A növényi embriogenezis sajátága, hogy nem csak a megtermékenyített petesejtben, de egyéb különböző sejtípusokban, köztük a szomatikus sejtekben is aktiválódhat az embrió fejlődés genetikai programja. Az embriogenezis minden formája esetén bizonyos feltételeknek teljesülniük kell, hogy a folyamat elindulhasson. A fajnak vagy genotípusnak genetikailag képesnek kell lennie arra, hogy testi sejtjeiből szomatikus embriókat hozhasson létre, valamint a növény vagy explantum néhány sejtjének kompetensé kell válnia egy külső és/vagy belső jel fogadására, mely elindítja az embriófejlődés útján.

Az embriófejlődés elindítása a kompetens sejtekben általában magában foglalja a sejtek külső és/vagy belső auxin szintjének megváltozását és együttjár a sejtek stresszválaszának aktiválásával is. Feltételezhetjük, hogy a szomatikus embriogenezis programjának elindítása egy általános válasz az együttesen érkező hormonális (auxin) jelek és stressz hatások összességére. Ez a válasz magában foglalja a sejt szintű és élettani újraszerveződés mellett a kromatin átrendeződését amely végső soron lehetővé teszi a máskülönben kromatin-mediált transzkripcionális represszió alatt álló embriogén fejlődési program lefuttatásának lehetőségét a vegetatív sejtekben.

A lucerna levélprotoplasztok egy meglehetősen homogén sejttenyésztési rendszert képeznek, mely részletes vizsgálatokat tesz lehetővé mind egyedi, mind pedig sejt populáció szintjén (Fehér és mtsai. 2005). A rendszer előnyeként említhető az is, hogy a sejtek további fejlődése 2,4-D koncentráció függő: 1  $\mu\text{M}$  2,4-D koncentráció megnyúlt, vakuolizált sejtek kialakulását eredményezi (nem embriogén sejtípus, NE), míg tízszeres töménységben ez a növekedésszabályozó anyag kicsi, sűrű citoplazmás embriogén sejtek kialakulásához vezet (embriogén sejtípus, EM) (Dudits és mtsai. 1991). Ez utóbbi sejtípus megfelelő körülmények biztosítása esetén képes kompakt, gömbalakú sejt kolóniákká („proembriókká”) majd azt követően szomatikus embriókká fejlődni.

Sok szövettenyésztési rendszer alkalmaz 2,4-D-t, mint hatékony szomatikus embriogenezist kiváltó ágenst. A 2,4-D képes a sejtsors megváltozását előidézni, melyet alátámaszt egy naftilecetsav (NES) jelenlétében tenyésztett lucerna sejteken (ún. mikrokalluszokon) végzett kísérlet (Dudits és mtsai. 1991; Györgyei és mtsai. 1991). Ha a sejteket egy órára igen magas (100 $\mu$ M) 2,4-D hatásának teszik ki, majd ezt követően hormonmentes táptalajra helyezik őket, akkor a sejtek szomatikus embriókká fejlődnek. Az első embriók a kezelést követő 3-4. héten kezdenek megjelenni a kallusz felszínén. Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a 2,4-D szükséges egy olyan program elindításához, mely a továbbiakban már halad a maga útján egyéb szabályozók hatása nélkül is. A 2,4-D eltávolítása az indukciós táptalajból fontos lehet a sejtpolaritás kialakulásának szempontjából, mely az egyik elsődleges sejt szintű eseményeknek számít az embrionális fejlődés elindulásakor (Samaj és mtsai. 2003).

Az embriogén kompetenciával összefüggésbe hozható gének közül a szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) gén az egyik legjobban jellemzett (Schmidt et al. 1997). Az *AtSERK* fehérje túltermeltetése elősegíti a szomatikus embriók képződését (Hecht és mtsai. 2001). A SERK gén kifejeződése éppen ezért az embriogén kompetencia kialakulásának széleskörben alkalmazott markere (Baudinho és mtsai. 2001; Nolan és mtsai. 2003). Egy másik, a szomatikus embriogenezis során fontos szerepet játszó embrióspecifikus transzkripció faktor gén, a LEC1. A gén túltermeltetése transzgenikus növényekben szomatikus embrió-jellegű képletek kialakulásához vezet a levelek felszínén.

A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben indukálódó embriogén kompetencia kialakulása során általunk azonosított gének közül az egyik, nagyfokú homológiát mutatott az emberi oxidation resistance 1 (*OXR1*) génnel. Ez a gén *Escherichia coli*-ban kifejezve képes megvédeni azok DNS-ét az oxidatív károsodástól. Az *OXR1* egy evolúciósan konzervált gén, és homológjai az élesztőtől az emberig bezárólag nagyon sok eukarióta szervezetben megtalálhatóak. Biológiai funkciójáról keveset tudunk, de az élesztő *OXR1* fehérje hiányos mutánsa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> érzékennyé vált (Volkert és mtsai. 2000). Az emberi hOxr1 képes az élesztő *oxr1*\_mutáns törzs

komplementálására, de ehhez szükséges a fehérje élesztő mitokondriumokba történő irányítása (Elliott és mtsai. 2004)

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Annak érdekében, hogy az embriogén kompetencia kialakulásakor bekövetkező génexpressziós változásokat feltérképezzük, egy PCR-alapú cDNS kivonási módszer segítségével össze kívántuk hasonlítani az EM és NE sejttípusokat. Kísérleteink során az alábbi alapvető kérdésekre kerestük a választ:

- milyen gének aktiválódnak a szomatikus sejtekből fejlődött embriogén potenciállal bíró sejtekben
- a génexpressziós mintázat alapján mi a 2,4-D szerepe az embriogén fejlődés elindításában lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben

A fent említett módszer segítségével azonosított gének közül az egyiket kifejeződési mintázata és feltételezett gyakorlati haszna miatt kiválasztottuk további jellemzés céljából. Ezt a gént MsOxprot-nak neveztük, s lúdfű homológjára pedig AtOxprot-ként hivatkozunk. Ezekkel a génekkel kapcsolatban az alábbi kérdéseket tettük fel:

- a szomatikus embriogenezis folyamata során indukálódott MsOxprot gén és annak lúdfű homológja képes-e komplementálni az *oxr1\_::URA3* élesztő mutáns törzs hidrogén-peroxid érzékenységét
- a két gén kifejeződése megváltozik-e különböző stresszkezelések során
- milyen sejten belüli lokalizációt mutat az MsOxprot gén által meghatározott fehérje
- okoz-e a gén kifejeződésének megváltoztatása fenotipikus változásokat transzgenikus, illetve mutáns növényekben

## **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

- Növény- és sejt kultúrák fenntartása, stresszkezelése
- Lucerna levélprotoplasztok izolálása és tenyésztése
- Növényi mitokondrium izolálás

- Idegen gént hordozó növények, sejtkultúrák létrehozása
- Génebézési módszerek, GATEWAY technológia
- RNS tisztítás, cDNS könyvtárak létrehozása, cDNS kivonás
- Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RTQ-PCR)
- Bakteriális fehérje termeltetés és fehérje tisztítás, Ellenanyag előállítás
- Növényi fehérjék tisztítása, Western blot, immunolokalizáció
- Élesztő kéthibrid szűrés és fehérje kölcsönhatás vizsgálat
- Fluoreszcens mikroszkóp használata

## **EREDMÉNYEK**

1. Azonosítottunk 38 db a lucerna levélprotoplaszt eredetű embriogén sejtekben a nem embriogén sejtekhez viszonyítva magasabb expressziós szintet mutató cDNS-t egy PCR-alapú cDNS kivonási módszer segítségével.
2. A cDNS szekvenciáknak megfelelő géneket/fehérjéket a gén-nevezéktani kifejezések segítségével funkcionális kategóriákba soroltuk, s a különböző csoportok 11 képviselőjét részletesebb génexpressziós vizsgálatoknak vetettük alá.
3. 2,4-D-vel kezelt lucerna leveleket vizsgálva a génkifejeződési mintázatok egy kivételével mind a 11 vizsgált gén esetében alátámasztották a 2,4-D indukáló hatását, beleértve a pozitív kontrollként használt leafy cotyledon1 (MsLEC1) gént is.
4. Lucerna mikrokallusz rendszerben valós idejű PCR segítségével jellemeztük a kiválasztott gének kifejeződési mintázatát mind a szomatikus embriogenezis korai indukciós, mind a kései embrió differenciálódási szakaszában
5. A kiválasztott gének közül nyolc a kontroll aktin gén kifejeződésével összevethető erősségű (egy nagyságrenden belüli) génkifejeződési szintet mutatott, mely erős génexpresszióra utal.
6. Megállapítottuk, hogy a lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék képesek komplementálni az *oxr1*\_mutáns élesztő törzs hidrogén-peroxid érzékenységét.

7. Az MsOxprot és AtOxprot gének relatív kifejeződése különböző stresszkezelések hatására megnőtt (paraquat, sebzés, hőstressz, szárazság és hipoxia).
8. Az MsOXPROT fehérje mitokondriális lokalizációját alátámasztottuk immunoblot és immunofluoreszcens vizsgálatok segítségével.
9. Élesztő kéthibrid szűrés során az AtOXPROT fehérje 18 potenciális kölcsönható partnerét sikerült azonosítani.
10. Az AtOxprot génhíányos T-DNS inszerciós mutáns *Arabidopsis* növények nem mutattak fenotipikus változást különböző stresszkörülmények között a vad típusú növényekhez képest.

## **AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE**

A protoplaszt eredetű sejtekben indukálódó szomatikus embriogenezis egy összetett folyamat, mely magában foglalja a sejtfaletől megosztott sejtek új sejtfaletének szintézisét, az izolációval együttjáró stresszhatások kivédését, a megváltozott környezeti feltételekhez való alkalmazkodást, a sejtosztódást, valamint az embriogén sejtorsó felé való elköteleződést. Azt feltételezhetjük, hogy a tápközeg 2,4-D koncentrációjának emelkedése mindezekre a paraméterekre hatással van. Mindezt alátámaszthatjuk azon gének azonosításával, melyek génkifejeződése megnőtt a magas (embriogén) 2,4-D koncentráció hatására lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben.

Harmincnégy olyan cDNS-t sikerült azonosítani, melyek az embriogén sejtekben magasabb expressziós szintet mutattak a nem embriogén sejtekhez képest. A cDNS szekvenciáknak megfelelő géneket/fehérjéket *Arabidopsis* adatbázishoz hasonlítottuk, s funkcionális kategóriákba soroltuk. A 38 gén közül 11 különböző funkcionális kategóriába (stresszhez-köthető; intracelluláris transzportoz köthető, transzlációhoz köthető; transzkripcióhoz/kromatinhoz köthető, feltételezett fehérjék) sorolható fehérjét kódoló gént választottunk ki a részletesebb vizsgálatokhoz.

Hogy a génkifejeződés 2,4-D koncentráció függését megerősítsük, fiatal lucerna leveleket 1 és 10  $\mu\text{M}$  2,4-D tartalmú folyadék tápközegben úsztattuk négy napig. A

megkésett (negyedik napos) génaktiváció azt jelezte, hogy a gének nem közvetlenül a 2,4-D-re válaszoltak, de kifejeződésük egyenes következménye volt a 2,4-D hatására beinduló sejtszintű változásoknak.

Hogy a szomatikus embriogenezis folyamán tovább vizsgálhassuk a 2,4-D génkifejeződésre gyakorolt közvetlen hatását, egy időben hosszabban elnyúló kísérletet végeztünk. Ehhez egy olyan sejtenyésztési rendszert alkalmaztunk, ahol a sejteket 1 órára igen magas, 100 $\mu$ M 2,4-D hatásának tették ki, majd ezt követően a sejteket mosták, és 6 héten keresztül hormonmentes táptalajon tartották fenn. Ebben a rendszerben a harmadik héten szomatikus embriók jelentek meg a tenyészetben. Génkifejeződési vizsgálatot az embriogén kompetencia kialakulásánál (első nap), és a szomatikus embriók megjelenésének idején (1-6 hét) végeztünk. A rövid idejű, de igen magas koncentrációjú 2,4-D hatására válaszképpen 6 gén mutatott megnövekedett relatív génkifejeződést. A stressz gének magasabb expressziója feltehetően a 2,4-D stressz-indukáló hatásának, a tenyészetet érő kezelésnek és a sejtek hormonmentes körülmények közé történő áthelyezésének tulajdonítható. Az intracelluláris transzportozható gének magas relatív génkifejeződése az endocitikus folyamatok fokozódását jelezheti.

Érdekes, hogy néhány gén, mely a magas 2,4-D koncentrációra válaszreakciót adott az első napon, szintén emelkedett kifejeződést mutatott a szomatikus embriók differenciálódásának idején hormonmentes körülmények között, 3-6 héttel az egy órás 2,4-D kezelés után. Ezen gének kifejeződési mintázatai kapcsolatban állhatnak a sejtek fejlődésbeni változásával (differenciáltból-dedifferenciáltba való átmenet az első napon a mikrokallusz szuszpenzió és a protoplaszt eredetű sejtek esetében, és dedifferenciáltból-differenciáltba történő átmenet 3-6 héttel a 2,4-D sokkot követően).

A kapott adatok hangsúlyozzák a testi sejtek dedifferenciált valamint embriogén állapotba történő átmenete során a sejtszintű folyamatok bonyolultságát. Azt szintén kijelenthetjük, hogy a rövid idejű (1 órás) 2,4-D kezelés közvetlen (első napon bekövetkező) és közvetett (3 hét múlva jelentkező) génexpressziós változásokat eredményez, mely arra utal, hogy ez a rövid kezelés is elegendő a

sejtek egyedfejlődési programjának megváltoztatásához. Mindezt jól mutatja az embriogenezis-kapcsolt transzkripció faktor LEC1 gén kifejeződése is.

Noha az azonosított gének expressziója talán használható az embriogén kompetencia megszerzésének és a szomatikus embriók kezdeti fejlődési stádiumának jellemzésére, a szomatikus embriogenezisben betöltött funkcionális szerepük bizonyítása még további kísérleteket kíván.

Az embriogén kompetencia kialakulása során azonosított gének közül további jellemzés céljából kiválasztottunk egy gyakorlati szempontból ígéretesnek ítélt lucerna cDNS-t (Oxprot). Megállapítottuk, hogy a lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék képesek komplementálni az *oxr1*\_mutáns élesztő törzs hidrogén-peroxid érzékenységét. Továbbá, immunoblot és immunofluoreszcens vizsgálatok segítségével bebizonyítottuk az MsOXPROT fehérje mitokondriális lokalizációját növényi sejtekben. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az MsOXPROT és az AtOXPROT fehérjék funkcionális homológjai az élesztő és emberi Oxr1 fehérjének. Azt feltételezhetjük, hogy mindkét OXPROT fehérje része lehet a mitokondriális stresszválasz útvonalnak. Mivel mind az MsOXPROT, mind az AtOXPROT fehérje a mitokondriumban lokalizálódva képes védelmet nyújtani az élesztő sejteknek az oxidatív károsodással szemben, feltehetően hasonló szerepet játszanak az oxidatív stresszel szembeni rezisztencia során növényi sejtekben is.

Az abiotikus és biotikus stresszfaktorok által aktivált jel és válaszútvonalak között vannak olyanok, melyek átfednek és így lehetővé teszik a sejtek számára a stressz válaszok koordinálását (Hong-bo és mtsai 2006). A lucerna és lúdfű Oxprot gének többféle stresszkezelés hatására is képesek indukálódni (szárazság, sebzés, paraquat, hőstressz, hipoxia) ami alkalmassá teheti őket arra, hogy a stresszválaszok során ilyen összehangoló szerepet töltsenek be. Az OXPROT fehérjék jelátviteli szerepére utal az a megfigyelésünk, hogy az Oxprot gének stressz aktiválása csak átmeneti jellegű, azaz a ROS hosszútávú detoxifikációjában nem vesznek részt.

Az AtOXPROT fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok során élesztő kéthibrid rendszerben 18 fehérje kölcsönható partnert sikerült azonosítani. Közöttük számos



stresszel kapcsolatba hozható gén van, mely tény szintén megerősíti az OXPROT fehérjék potenciális szerepét a stresszválaszokban.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Baudino, S., Hansen, S., Brettschneider, R., Hecht, V. F., Dresselhaus, T., Lorz, H., Dumas, C., Rogowsky, P. M.** (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* **213**:1-10.
- Dudits, D., Bögre, L., Györgyey, J.** (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Sci.* **99**:475-484
- Elliott N.A., Volkert M.R.** (2004) Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol.*; **24**:3180–3187
- Fehér, A., Pasternak, T., Ötvös, K., Dudits D** (2005) Plant protoplasts: Consequences of lost cell walls. In: *Journey of a Single Cell to a Plant*, S. J. Murch és P. K. Saxena, szerk. (Enfield, NH, USA: Science Publishers, Inc.), pp. 59-90.
- Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., Dudits, D.** (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**:999-1007
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, S. C.** (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* **127**:803-816
- Hong-bo, S., Li-ye, C., Chang-xing, Z., Qing-jie, G., Xian-an, L., Jean-Marcel, R.** (2006) Plant Gene Regulatory Network System Under Abiotic Stress, *Acta Biologica Szegediensis*, Volume **50**(1-2):1-9
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. L., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J.** (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**:1195-1205.
- Nolan, K. E., Irwanto, R. R., Rose, R. J.** (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* **133**:218-230
- Samaj, J., Baluska, F., Pretova, A., Volkmann, D.** (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep.* **21**:940-945
- Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., de Vries, S. C.** (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**:2049-2062
- Volkert, M.R., Elliott, N.A., Housman, D.E.** (2000) Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** 14530–14535

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

† **Domoki, M.**, Györgyey, J., Bíró, J., Pasternak, T.P., Zvara, Á., Bottka, S., Puskás, L. G., Dudits, D. and Fehér, A. : (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1759**, 543-551

**Domoki, M.**: (2005) Oxidative stress tolerance and plant development: the functional characterization of “oxprot” gene. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(3-4):45

Pasternak, T.P., Ötvös, K., **Domoki, M.**, Fehér, A: (2007) Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulation*, 51:2, 109-117(9)

Ötvös, K., Pasternak, T.P., 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

Szűcs, A., Dorjgotov, D., Ötvös, K., Fodor, Cs., **Domoki, M.**, Györgyey, J., Kaló, P., Kiss Gy.,B., Dudits, D. and Fehér, A.: (2006) Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1759, 108-115

---

† A dolgozat alapjául szolgáló közlemény

## TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott felelős szerző nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerjük, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtuk fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogjuk felhasználni. Elismerem, hogy Domoki Mónikának az alábbi közlemény eredményeinek elérésében meghatározó szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja.

**Domoki, M.**, Györgyey, J., Bíró, J., Pasternak, T.P., Zvara, Á., Bottka, S., Puskás, L. G., Dudits, D. and Fehér, A. : (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1759**, 543-551

.....

Dr. Fehér Attila  
felelős szerző, témavezető

Szeged, 2009. 05. 20