

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 tenyésztését, 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 éhezéssel

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 sejt fal 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 sejtuszpenzióét sem, de késleltette a foszfátéheztesített 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) vaséheztesített 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

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

Az NO donor SNP kezelés hatására alacsony (1 μM) 2,4-D jelenlétében embriogén típusú sejtek jelentek meg a táptalajban, olyanok, amilyenek magas (10 μM) 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 μM) 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 irányítással 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