

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

Doktori értekezés tézisei

**A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) LOB-domain transzkripciós  
faktorok géncsaládjának jellemzése, és két fehérjéjének kölcsönhatás-  
vizsgálata**

Gombos Magdolna



Témavezető: Dr. Györgyey János - tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont –  
Növénybiológiai Intézet

**2017**  
**Szeged**

## Bevezetés

A magasabb rendű edényes növények struktúrája leegyszerűsítve a hajtástengelyből, a róla elágazó oldalhajtásokból, az azokon fejlődő vegetatív és generatív szervekből, valamint a központi gyökérből és az oldalgyökerekből épül fel. E szervek létrehozása szinte teljes egészében posztembrionálisan megy végbe – vagyis a növények a magasabb rendű állatoktól eltérő módon teljes életciklusuk alatt képesek új szervek, szövetek létrehozására. Ez a kivételesen rugalmas egyedfejlődési program nemcsak bámulatos formagazdagságot és folyamatos növekedést tesz lehetővé, de egyben az állandóan változó környezethez történő alkalmazkodás záloga is a szesszilis életmódot folytató növények számára.

A növények lenyűgöző plaszticitása két forrásra vezethető vissza: egyrészt a pluripotens osztódóképes szöveti régiók (merisztémák) aktivitása, másrészt a már differenciálódott sejtek azon képessége, hogy bizonyos körülmények között visszanyerhetik pluripotenciájukat – biztosítja a növényekre jellemző nyitott, folyamatos növekedésre képes egyedfejlődési programot. A pontos és arányos szervfejlődés szempontjából ugyanakkor a növények esetében is nélkülözhetetlen a sejtek osztódásának és az utódsejtek differenciációjának korrekt időbeli és térbeli szabályozása. Ebben a folyamatban kiemelt jelentőséggel bír a merisztémák és a fejlődő új szerv közötti határ kijelölése. Jelenlegi ismereteink szerint ez a határ nem egyfajta filozófiai „vagy merisztéma vagy fejlődő szerv” szélsőséges állapota közötti döntést jelenti, hanem sokkal inkább egy jól definiálható, specializált sejtek alkotta diszkrét fizikai választóvonal. A határvonalat meghúzó sejtek nemcsak a merisztematikus szöveti régiók pluripotenciájának fenntartásához szükséges mikrokörnyezet behatárolásához szükségesek, hanem az osztódó szövetek és a belőlük fejlődő szervprimordiumok közötti kapcsolat fenntartása szempontjából is nélkülözhetetlenek. A határoló sejtek környezetüktől markánsan eltérő génexpressziós mintázattal jellemezhetők: ilyen jellegzetes, csak a határoló sejtekben aktív gének pl. a CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC), PETALLOS (PTL) vagy a BLADE ON PETIOLE (BOP) transzkripciós faktorokat kódoló gének. Az itt működő egyedi transzkripciós faktorok közötti bonyolult kapcsolatrendszer koordinálja a merisztematikus sejtek osztódását és az utódsejtek differenciációját.

Ilyen, az oldalszervek képződési helyén, a merisztémák a primordiumok határán kifejeződő génként írták le az első LOB-domain transzkripciós faktort (LBD) kódoló gént, mintegy 15 évvel ezelőtt, lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) végzett ún. „enhancer trapping” kísérletek eredményeként. Az elnevezés is ebből a speciális kifejeződési mintázatból ered:

LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) – vagyis „oldalszervek határán működő”, „oldalszervek határát kijelölő” gén. Az általa kódolt fehérje funkciója bár akkor még teljesen ismeretlen volt, annyit meg lehetett jósolni, hogy N-terminálisán tartalmaz egy 100 aminosav hosszú szerkezeti motívumot, a LOB-domain (DUF260-domain of unknown function), mely három szerkezeti elemből épül fel: tartalmaz egy négy ciszteinből álló „C-blokk” egységet (CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>C), mellette egy központi glicin-alanin-serin motívummal rendelkező „GAS-blokkot” és egy leucin-zipper jellegű motívumot (LX<sub>6</sub>LX<sub>3</sub>LX<sub>6</sub>L). Az eddigi vizsgálatok alapján a C-blokk felelős a DNS-kötő aktivitásért, a leucin-zipper jellegű szelvény pedig fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását teszi lehetővé. Maga a LOB-domain motívum 42 további *Arabidopsis* fehérjében is megtalálható; és egy meglehetősen konzervált, viszonylag népes (fajonként ált. néhány tucat gént tartalmazó), a *Cariophitae* algáktól kezdve a zárvatermőkig minden vizsgált növényben előforduló transzkripciós faktor-családról van szó. Mivel LOB-domainnel vagy hasonló szerkezeti motívummal rendelkező fehérjét növényi adatbázisokon kívül eddig sehol sem találtak, az ide tartozó fehérjék kétséget kizáróan növényekre specifikus folyamatokban vesznek részt.

A LOB-domain transzkripciós faktorok által irányított folyamatok döntő többsége szervfejlődés irányításával kapcsolatos. A felfedezésük óta már sokrétűen igazolták, hogy az oldalszervek határának kijelölésén túl a legkülönbélebb szervfejlődést érintő folyamat irányításában részt vesznek, mint pl. fotomorfo-genetikus folyamatok, levélmorfológia meghatározása, oldalgökerek képződése, virágfejlődés, mikrosporogenezis, kalluszképződés és *in vitro* regeneráció. Egy-egy LBD transzkripciós faktor egyszerre több különböző szerv fejlődési folyamatait is irányíthatja, és gyakori, hogy ezeket a feladatokat más-más LBD transzkripciós faktorokkal kombinációban látják el. Sokrétű funkciójuk ellenére úgy tűnik, hogy az LBD fehérjék általánosságban külső környezeti jelek és növényi hormonok (pl. auxin, citokiniek, brassinoszteroidok) jelentette belső szignálok fejlődési programmá történő „lefordításában” játszanak nélkülözhetetlen szerepet. Bár ennek mechanizmusa és a háttérben álló molekuláris hálózatok még kevésbé ismertek, az eddigi kutatási eredmények arra engednek következtetni, hogy az LBD transzkripciós faktorok a sejtciklus szabályozásával szoros összefüggésben határozzák meg egy-egy szerv megfelelő fejlődését. LBD gének rendellenes működése miatt kialakuló abnormális fenotípusok számos esetben járnak együtt sejtosztódási és differenciálódási hibákkal. Néhány eklatáns példa: a lúdfű AtLBD6 hiányában fellépő aszimmetrikus levélmorfológia az adaxiális/abaxiális szimmetriatengelyt kialakító sejtek dedifferenciációjának és fokozott proliferációjának köszönhető, míg kukoricában (*Zea mays*)

megtalálható orthológja, a ZmIg1 (Indeterminate gametophyte1) hiánya egyebek mellett a termőtáj rendellenességeit idézi elő (extra szinergida sejtek megjelenése és több petesejt a termőben), ami a magkezdemény osztódási fázisának kitolódásával magyarázható. Szintén lúdfüvből ismert az AtLBD27/SCP (SIDE CAR POLLEN), mely a mikrospóra sejtek osztódásának időzítését és a sejtek osztódásának irányát is megszabja.

Arra vonatkozóan, hogy a LOB-domain transzkripciós faktorok miként kapcsolódnak be a sejtciklus szabályozásának jól ismert folyamatába, kevés ismeret áll rendelkezésünkre. A sejtosztódás és az LBD transzkripciós faktorok közvetlen kapcsolatára utalnak munkacsoportunk eddig még nem publikált eredményei: élesztő két-hibrid (Y2H – yeast two hybrid) rendszerben végzett kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a lucerna (*Medicago sativa*) egyik A2 típusú ciklinjének kölcsönható partnere egy LBD fehérje, az MtCPP1 (cyclin partner protein1). Ugyan a közel 20 évvel ezelőtti kutatás célja a lucerna A2 ciklin kölcsönható partnereinek felderítése volt, figyelmünket néhány évvel ezelőtt a LOB-domain transzkripciós faktorok felé irányította.

### **Célkitűzések**

Az LBD gének, köszönhetően szervfejlődésben betöltött sokrétű szerepüknek, az utóbbi évek intenzívebben tanulmányozott génjei közé kerültek. Megismerésük lehetőséget nyújt nemcsak a merisztémák és a fejlődő szervek határán működő molekuláris mechanizmusok mélyebb megértéséhez, de minél több fajra kiterjedő átfogó vizsgálatuk a növényi egyedfejlődés evolúciójába is betekintést enged. Ezzel együtt az LBD génekre vonatkozó ismereteink jelentős része lúdfüvel végzett kutatások eredményeire támaszkodik, más növényfajokban, így egyszikűekben megtalálható LBD génekről kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Munkánk során egyik célunk éppen ezért a géncsalád átfogó feltérképezése volt szálkaperjében (*Brachypodium distachyon*), mint kalászos gabonaféléink modellnövényében. Ezzel kapcsolatban három lényeges célkitűzésünk volt:

- Az LBD transzkripciós faktorokat kódoló gének azonosítása a szálkaperje genomjában.
- Az azonosított LBD transzkripciós faktorok részletes filogenetikai analízise, rokonsági kapcsolatainak vizsgálata más fajokban már azonosított LOB-domain transzkripciós faktotokkal.

- A szálkaperje LBD transzkripciós faktorait kódoló gének szerv-specifikus kifejeződésének vizsgálata, részletes expressziós profil készítése és a kapott mintázatok összehasonlítása más növényfajok LBD génjeinek már ismert kifejeződésével.

Bár konkrét bizonyítékokkal még nem támasztották alá, az eddigi kutatások alapján úgy tűnik, a LOB-domain transzkripciós faktorok a sejtosztódási és differenciálódási folyamatok határán teremtenek egyensúlyt. A továbbiakban a szálkaperje azonosított LBD génjei között két olyan génre fókuszáltunk, melyek a legnagyobb homológiát mutatták a *Medicago truncatula* már említett MtCPP1 génjével. Korábbi vizsgálataink tanulsága alapján az MtCPP1 által kódolt LOB-domain transzkripciós faktor kölcsönhatásban állhat a *Medicago* A2 típusú mitotikus ciklinjével. Tekintettel arra, hogy a *Medicago* A2 ciklinje bizonyítottan szerepet játszik a gyökér periciklus sejtjeinek reaktiválásában, kapcsolata az LBD transzkripciós faktorokkal meghatározó lehet a gyökérfejlődés szempontjából. Kíváncsiak voltunk arra, hogy hasonló kapcsolatok lehetnek-e szálkaperjében is? Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatához kapcsolódó célkitűzésünk az alábbi volt:

- A *Medicago* A2 ciklin szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológja és a *Medicago* MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjai közötti kölcsönhatás tesztelése élesztő két-hibrid rendszerben.

## **Anyagok és alkalmazott módszerek**

### *A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak in silico vizsgálatához kapcsolódó módszerek*

A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak beazonosítása céljából kétféle megközelítést alkalmaztunk: első megközelítésben a lúdfű már ismert LOB-domain transzkripciós faktorainak aminosav-szekvenciáit használtuk fel referenciaként a szálkaperje teljes proteomjával (Phytozome v12 portál – <http://phytozome.org>, *Brachypodium distachyon* v3.1 adatbázis) szembeni átfogó BLAST analízishez. Második lépésként a Pfam (<http://pfam.xfam.org>) és a SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) szekvencia-elemző portálok segítségével beazonosítottuk a BLAST keresés eredményeként kapott szekvenciákban a konzervált szekvencia-motívumokat. Végeredményben azokat a fehérjéket tekintettük egyértelműen LBD transzkripciós faktornak, melyek a Pfam adatbázis PF03195 (DUF260) családjába sorolódtak konzervált motívumaik alapján.

A kapott szekvenciák filogenetikai analízisét a MEGA6 szoftver (<http://www.megasoftware.net/>) segítségével végeztük el (BLOSUM62 szubsztitúciós mátrix, Neighbour Joining módszer), a beazonosított szálkaperje LBD fehérjék konzervált, LOB-domain motívumát reprezentáló aminosav-szekvenciáira korlátozva. Az előbbiekkal azonos módon megvizsgáltuk a szálkaperjében azonosított LBD transzkripciós faktorok és más fajokból már ismert LBD transzkripciós faktorok közötti filogenetikai kapcsolatokat is, melyhez a szálkaperje mellett a kukorica (*Zea mays*), a rizs (*Oryza sativa*) és a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) LBD transzkripciós faktorainak konzervált domain-motívumát reprezentáló aminosav-szekvenciáit használtuk fel.

A szálkaperje teljes genomjának synteny-analízise (szinténia-analízis) és génduplikációs eseményeinek vizsgálata a Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication>) adatai alapján készült.

#### *Az LBD gének expressziós profiljának vizsgálatához kapcsolódó módszerek*

A génexpressziós vizsgálatához a nagy pontosságú, megszekvenált genommal bíró Bd21-es szálkaperje ökotípus növényeit használtuk. A magokat 4 napos sztratifikálást követően homok:perlit 2:1 arányú keverékébe ültettük. A növényeket kontroll körülmények között, növénynevelő kamrában neveltük a mintavétel időpontjáig (fotoperiódus: 18 h megvilágítás/ 6 h sötét; fényerősség:  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; hőmérséklet: 21-22 °C; relatív páratartalom: 60-65%; normál vízellátottság: a nevelőközeg 80% víztartalmáig, a mintavétel időpontjáig minden nap 0,5% Hoagland tápoldattal locsolva - a neveléshez használt homok:perlit relatív 100%-os vízkapacitása 260-265 g/kg). Összesen 37 különböző növényi részből gyűjtöttünk mintát, sztereomikroszkóp segítségével: 25 növényi részt 14 napos, négy leveles állapotú, vegetatív stádiumú növényekből (6 különböző gyökérszegmens, 5 hajtásnódusz, 2 internódium, 4 különböző fejlettségi állapotú levél és részei: levéllemez, levél ligula, levélhüvely) gyűjtöttünk be, 9 növényi rész 28 napos, generatív stádiumú növényből származott (zászlóslevél lemeze, a virágzat különböző részei, 3 eltérő fejlettségi állapotú virág, portok), 3 minta (3 eltérő fejlettségi állapottú termés) 40-45 napos növényből került begyűjtésre. Megközelítőleg 200 növény került felboncolásra az RNS izoláláshoz szükséges 50-100 mg-nyi növényi anyag begyűjtéséhez az egyes mintákból.

A szálkaperje LBD géneinek relatív transzkript mennyiségeit az egyes LBD génekre tervezett specifikus primerek segítségével, két referenciagén kifejeződéséhez viszonyítva,

valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) módszerrel határoztuk meg. Ehhez az egyes növényi részekből izolált totál RNS tartalomból cDNS templát készült. A transzkript mennyiségek detektálása ABI Prism 7900-HT Fast Real-Time készülékkel történt, sztenderd beállításokkal.

#### *Az élesztő két-hibrid vizsgálatokhoz kapcsolódó anyagok és módszerek*

A korábbi kísérletek alapján kölcsönható partnernek bizonyuló *Medicago truncatula* MtCPP1 (MTR\_5g083960) és *Medicago sativa* MsA2;2 ciklin (CAB46083 – a továbbiakban MsCYC-A2) szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjait TBLASTX analízissel azonosítottuk be, a szálkaperje genom adatbázisával szembeni kereséssel. Az analízis alapján a szálkaperje egyetlen A2 típusú ciklinjét (Bd4g06827 – a továbbiakban BdCYC-A2) és két LBD transzkripciós faktort kódoló génjét (Bd2g34520 – a továbbiakban BdLBD1C-1 és Bd2g53690 – a továbbiakban BdLBD1C-2) választottuk ki az Y2H vizsgálatokhoz. A kölcsönhatás teszteléséhez klónozással az alábbi konstrukciókat hoztuk létre, két különböző vektor-rendszer vektorait (Clontech) felhasználva: a BdCYC-A2 génjét a „csali” vektorokba (pGBK-T7 és pGBK-T9), míg a szálkaperje kiválasztott LBD transzkripciós faktorainak génjeit egyenként a „préda” vektorkonstrukciókba klónoztuk (pGAD-T7 és PGAD-424). A létrehozott konstrukciókat többféle kombinációban transzformáltuk be párban az élesztő kompetens sejtekbe. A kísérletek során az autokativálás teszteléséhez üres vektorokkal párban történő transzformációkat végeztünk, negatív kontrollként, míg pozitív kontroll gyanánt a pBD-GAL4-MsCYC-A2 és pAD-GAL4-MtCPP1 kombinációk szolgálták.

A kölcsönhatási teszthez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1 UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1) és PJ69-4A (MATa trp1- $\Delta$ 901, leu2-3,112 901, ura3-52, his3- $\Delta$  200, gal4 $\Delta$ , gal8 $\Delta$ , GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ) törzseit használtuk. A kompetens sejtek létrehozása és kémiai transzformációja a „Yeast Protocols Handbook” (Clontech, 2001) kézikönyvben leírtak alapján történt. A kiválasztott fehérjék kölcsönhatását kétféle módon teszteltük: a transzformáns élesztők minimál (SD), -triptofán (W), -leucin (L), -hisztidin (H), -adenin (A) mentes táptalajon (SD-WLHA) történő nevelésével valamint  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás méréssel.

## Az eredmények összefoglalása

A részletes szekvencia-elemzések eredményeként 28 LOB-domain transzkripció faktor kódot azonosítottunk be a szálkaperje genomjában. Filogenetikai vizsgálataink alapján a szálkaperje LOB-domain transzkripció faktorai két nagyobb osztályra (II és I), az I osztályon belül további öt alcsoportra (A-E) sorolhatók. A szálkaperje LBD génjeire általunk bevezetett nomenklatura ezt a besorolást tükrözi: pl. BdLBD1A-1, ahol jelölve van az adott fehérje osztálya, az egyes típusba tartozó fehérjék esetében az alosztály, az adott fehérje egyedi azonosító száma pedig az alosztályon belüli divergenciára utal (a legkorábban divergált tag kapta az 1. számot, a legkésőbb divergált tag pedig a legmagasabbat). A szálkaperje LBD génjeinek filogenetikai alapú besorolása összhangban áll más fajokban végzett hasonló elemzések eredményeivel. A rizs, a kukorica, a lúdfű és a szálkaperje LOB-domain transzkripció faktorainak összehasonlító filogeneikai analízise alapján nem találtunk csak a szálkaperjében előforduló, egyedi LBD géneket, sem az egyszikűekre jellemző leszármazási vonalat a géncsaládon belül. Különbség az egyes alcsoportok komplexitásában mutatkozott: egyszikűekben a B-alcsoport, míg kétszikűekben inkább az A-alcsoport kiterjedtebb. A géncsalád evolúciós eredetét vizsgáló kutatások alapján az LBD gének diverzifikációjában nagy szerepe volt a teljes genomot érintő duplikációs eseményeknek és az ezt követő diszpergálódásnak, valamint annak, hogy a duplikációs eseményeket követően az LBD géncsalád tagjai prezerválódtak, megmaradtak az evolúció során. A kromoszomális régiók kollinearitásán alapuló *in silico* elemzésünk szerint ez alól a szálkaperje LBD géncsaládjában sem kivétel. Becsléseink szerint a szálkaperje LBD génjeinek mintegy 40%-a duplikációs események eredménye.

Az LBD génekre jellemző nagyfokú funkcionális divergencia kétség kívül erre az evolúciós történetre vezethető vissza, és ezt tükrözi vissza az LBD génekre jellemző nagyon változatos kifejeződési mintázat is. A qRT-PCR technikával feltérképezett részletes expressziós vizsgálat alapján a szálkaperje LBD génjeinek szövet/szervspecifikus kifejeződése nemcsak alcsoportonként egyedi, de gyakran csoporton belül is nagy heterogenitást mutat, és sokszor még az egymással közel rokon LBD gének kifejeződése is jelentősen eltér egymástól. Néhány jellegzetesség ennek ellenére megállapítható: így pl. az IA alcsoport génei leginkább a virágzatban és a levél szöveteiben expresszálódnak, az IB alcsoportra inkább gyökérspecifikus kifejeződési mintázat jellemző, az IE alcsoport tagjai pedig inkább a portokban expresszálódnak. Tőlük eltérően az IC, ID alosztályok tagjai igen változatos kifejeződési



mintázattal rendelkeznek. Így pl. az IC alcsaládon belül van olyan gén, amely csak a vegetatív növényi részekben aktív, van olyan, amelyik a gyökérben és a generatív szervekben működik, de olyan is akad, amelyik csak a gyökér egyes szegmenseiben mutat expressziót. Az ID alcsalád esetében az LBD1D-1 csak a levél különböző részeiben, míg az LBD1D-2 szinte minden vegetatív szervben kifejeződik. Egyedül a II osztály génjeire jellemző a nem szövetspecifikus expresszió. A szálkaperje egyes LBD génjeinek kifejeződési mintázata nagyfokú hasonlóságot mutat más fajokban (pl. lúdfűben, kukoricában, rizsben) azonosított legközelebbi rokonaik kifejeződési mintázatával. A különböző, akár egymástól távoli rokon fajok LBD génjeinek kifejeződési mintázatai között tapasztalható egyezések alapján feltételezhetjük, hogy az egyes LBD gének funkciója evolúciósan nagymértékben konzervált lehet.

Munkacsoportunk erre a konzerváltságra alapozva kezdte el a géncsalád két tagjának, a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 funkcionális jellemzését. Korábbi élesztő-két hibrid kutatási eredményeink alapján a lucerna (*M. sativa*) A2;2 ciklinje és a *M. truncatula* egyik LOB-domain transzkripciós faktora, az MtCPP1 kölcsönható partnerek lehetnek. Homológiájuk alapján a BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 fehérjéről - mint az MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi rokonairól - feltételezzük, hogy az MtCPP1-hez hasonlóan közvetlen kapcsolatban állnak a sejtciklus szabályozásával. Ennek alátámasztását célozták a lucerna A2 ciklinje és az MtCPP1 közötti kölcsönhatás reprodukálására irányuló kísérleteink élesztő kéthibrid (Y2H) rendszerben, szálkaperjében megtalálható homológjaikkal. A szálkaperje A2 ciklinje és a BdLBD1C-1 valamint BdLBD1C-2 között kölcsönhatás kimutatása Y2H vizsgálatokkal zömmel negatív eredményre vezetett: ugyan többféle vektort próbáltunk ki többféle kombinációban, két különböző élesztő törzsben is, sem az auxotrófia-komplementáción alapuló növekedési szelekcióval, sem a transzformáns élesztőkből történő  $\beta$ -gamaktozidáz aktivitás méréssel nem sikerült kölcsönhatást kimutatni a kérdéses fehérjék között. Ennek oka nem feltétlenül a kölcsönhatás teszteléséhez kiválasztott fehérjék közötti tényleges kölcsönhatás hiányában keresendő, hanem a tesztelések tanulsága alapján az Y2H rendszer korlátaival is magyarázhatók (pl. a szálkaperje A2 ciklinjének élesztő sejtek növekedésére gyakorolt negatív hatásával -melyet tapasztaltunk is kísérleteink során).

Pozitívum ugyanakkor, hogy mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 kölcsönhatásba lépett a lucerna A2;2 ciklinjével, a szálkaperje A2 ciklinje pedig az MtCPP1 fehérjével mutatott kölcsönhatást. Vagyis az Y2H tesztelések eredménye alapján potenciálisan mind a

BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 képes lehet ciklinel/ciklinekkel való interakcióra, a vizsgálatba bevont száklaperje A2 ciklin pedig LOB-domain transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatásra, mely eredmények a LOB-domain transzkripciós faktorok és a sejtciklus szabályozásának közvetlen kapcsolatára utalnak. Ebbe az irányba mutatnak munkacsoportunk még publikálatlan eredményei is: *in vitro* foszforilációs kísérletek alapján a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 is képes foszforilálódni a száklaperje sejtuszuspenzióból izolált ciklin-ciklin dependens kináz komplexek által. Az itt bemutatott eredményekre támaszkodva azonban még messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 és a sejtciklus szabályozása közötti direkt kapcsolatokról, és több a felmerülő kérdés, mint amennyire jelen pillanatban válaszolni tudunk. Nem tudjuk, ebben a folyamatban mely ciklin-CDK komplex vesz részt. Nem ismert ennek a szabályozási folyamatnak a szervfejlődésre gyakorolt hatása sem. Felmerül a kérdés, lehetnek-e esetleg más ciklin-CDK komplexek által szabályozott LOB-domain transzkripciós faktorok is? Az sem tisztázott, hogyan befolyásolja a ciklin-CDK komplexek által történő szabályozás a LOB-domain transzkripciós faktorok működését; és az is kérdéses, ez a feltételezhető szabályozási kapcsolat mennyire általános a növényvilágban. Ezeknek az alapvető kérdéseknek a megválaszolása további részletes kutatásokat igényel. Tervezett kutatásaink a LOB domain transzkripciós faktorok és a ciklinek közötti kölcsönhatás funkciójának értelmezésére irányulnak. Ennek feltárása a növényi egyedfejlődés izgalmas és ismeretlen területének - a sejtosztódás és a differenciálódás összefonódásának- megismerése felé vezet.

## **Következtetések**

A száklaperje LBD transzkripciós faktorainak átfogó jellemzése érdekében végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy

- a száklaperje 28 tagból álló LOB-domain transzkripciós faktor családjának főbb csoportjai, alcsaládjainak szerkezete, a fehérjék megoszlása az azlcsoportok között más egyszikű és kétszikű fajokhoz viszonyítva alapvetően hasonló. Ennek magyarázata a család konzerváltságában keresendő.
- a száklaperje LOB-domain transzkripciós faktorait kódoló gének kifejeződési mintázata a LOB-domain transzkripciós faktorokról eddig feltárt funkcionális sokféleségnek megfelelően nagy divergenciát mutat mind szövetspecifitás, mind az expresszió mértékét tekintve. Bár heterogén kifejeződési mintázat alapján nem

lehet egy-egy alcsaládnak egyértelmű funkciót társítani, de a kapott kifejeződési mintázatok nagyfokú hasonlóságot mutatnak más fajokban már ismert homológ LBD gének kifejeződési mintázataival, ami a géncsalád funkcionális konzerváltságát sejteti.

- bár az expressziós mintázat ismerete az LBD gének szerepének megértéséhez messze nem elegendő, az általunk végzett génexpressziós vizsgálat jó kiindulópont a funkcionális vizsgálatokhoz.

A LOB-domain transzkripciós faktorok sejtciklus szabályozásával való kapcsolatának vizsgálatát korábbi kísérleteinkre alapozva kezdtük el. Ennek részeként teszteltük a *Medicago sativa* A2 ciklin szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológja és a *Medicago truncatula* MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjai, a szálkaperje A2 ciklin és a BdLBD1C-1 valamint 1C-2 közötti kölcsönhatást élesztő két-hibrid rendszerben. Bár a kölcsönhatás kimutatására irányuló kísérleteink zömmel negatív eredményre vezettek, a tesztelés eredményeként megállapítható, hogy:

- potenciálisan mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 képes lehet ciklinel/ciklinekkel való interakcióra.

### **Köszönetnyilvánítás**

Munkánkat két OTKA-program (OTKA-K76273 és OTKA-K109719) valamint egy GINOP támogatás (GINOP-2.3.2-15-2016-00001) finanszírozta. A jelölt tanulmányait a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolaója állami ösztöndíjjal, a Magyar Tudományos Akadémia fiatal kutatói ösztöndíjjal támogatta.

## Tudományos közlemények

### *A disszertáció alapjául szolgáló közlemények*

- Gombos, M., Zombori, Z., Szécsényi, M., Sándor, G., Kovács, H., & Györgyey, J. (2017). **Characterization of the LBD gene family in *Brachypodium*: a phylogenetic and transcriptional study.** *Plant Cell Reports*, 36(1), 61-79. IP<sub>2016</sub>: 3.088
- Zombori, Z., Facskó, L., Gombos, M., Szécsényi, M., Sándor, G. & Györgyey, J. (2017). **Development and optimization of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method in *Brachypodium distachyon*.** *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, (submitted) IP<sub>2016</sub>: 0.532

### *Egyéb közlemények*

- Csiszár, J., Gallé, Á., Horváth, E., Dancsó, P., Gombos, M., Váry, Z., ... & Tari, I. (2012). **Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 119-129. IP<sub>2012</sub>: 2.775

MTMT azonosító:10053234

## Konferenciaközlemények

János Györgyey, Mária Secenji, Zoltán Zombori, Magdolna Gombos, Mátyás Cserhádi, Dénes Dudits: **Towards understanding of links between drought adaptation and root architecture of cereals.**FESPB/EPSO Plant Biology Congress, Freiburg 2012

Zoltán Zombori, Mária Szécsényi, Magdolna Gombos, János Györgyey: **Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method in *Brachypodium distachyon* for the characterization of LOB transcription factors.** Pannonian Plant Biotechnology Conference for PhD students in connection to the EPSO Fascination of Plants Day, Keszthely, 2013

Zoltán Zombori, Mária Szécsényi, Magdolna Gombos, János Györgyey: ***Agrobacterium*-mediated transformation method improvement, and characterization of LOB-domain transcription factors in *Brachypodium distachyon*.** XI. Congress of the Hungarian Society for Plant Biology, 27-29th Aug 2014, Szeged, Hungary

Z. Zombori, M. Szécsényi, M. Gombos, Gy. Sándor, J. Györgyey: **The use of *Brachypodium distachyon* as a cereal model to study functions of genes involved in organ development.** "Integration fundamental research into the practical agriculture" Pannonian Plant Biotechnology Workshop, 8 - 10 June, 2015, Ljubljana, Slovenia

J. Györgyey Z. Zombori, M. Gombos, M. Szécsényi: **Use of *Brachypodium distachyon*, the model plant of temperate cereals to study root architecture during drought adaptation.** "The 26<sup>th</sup> Even-Ari Memorial Conference" Israeli-Hungarian scientific workshop on sustainable agriculture, 26-27 April, 2015, Sede Boqer, Israel

János Györgyey, Magdolna Gombos, Gábor V. Horváth, László Facskó, Györgyi Sándor, Mária Szécsényi, Zoltán Zombori: **LOB-domain transcriptional factors are not only key components of plant root development but may link cell division and differentiation in *Brachypodium distachyon*.** Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, Prague (June 26-30, 2016)

### **Konferencia előadások**

M. Gombos, Z. Zombori, M. Szécsényi, Gy. Sándor, J. Györgyey: **The genes of an organ development regulating transcription family in *Brachypodium distachyon*.** Advances in Plant Breeding & Biotechnology Techniques, Pannonian Plant Biotechnology Conference for PhD students, Mosonmagyaróvár, 2014

Gombos M., Zombori Z., Szécsényi M., Sándor Gy., Györgyey J.: **LOB-ogó lelkesedéssel a sejtosztódás és differenciálódás folyamatainak megértéséért.** Magyar Növénybiológiai Társaság; Fiatal Növénybiológusok Előadásai, Pécs, 2015

Gombos Magdolna, Zombori Zoltán, Horváth Gábor, Szécsényi Mária, Sándor Györgyi, Györgyey János: **LOB-domain transzkripció faktor család szálkaperjében (*Brachypodium distachyon*).** Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, "FIBOK2016", Gödöllő

Gombos M., Zombori Z., Horváth G., Szécsényi M., Sándor Gy., Györgyey J.: **A LOB-domain transzkripció faktorok szervfejlődési folyamatokban beöltött szerepének vizsgálata szálkaperjében (*Brachypodium distachyon*).** A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. kongresszusa, Szeged, 2017.

### **Konferencia posztterek**

Jolán Csiszár, Ágnes Gallé, Edit Horváth, Piroska Dancsó, Bernadett Pintér, Magdolna Gombos, Zoltán Váry, János Györgyey, László Erdei, Irma Tari: **Differences in growth, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, peroxidase activity and peroxidase transcript amounts during osmotic stress in roots of two wheat genotypes.** 1st Congress of Cereal Biotechnology and Breeding (24-27 May, 2011, Szeged)

Mária Szécsényi, Magdolna Gombos, János Györgyey: **A versatile cold regulated gene.** Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress (2012, Freiburg)

Mária Szécsényi, Zoltán Zombori, Magdolna Gombos, Györgyi Sándor, János Györgyey: **Root architecture of *Brachypodium* – morphological, molecular and genetic approaches.** 1st International *Brachypodium* Conference 2013, Modena, Italy

Zoltán Zombori, Mária Szécsényi, Magdolna Gombos, János Györgyey: **Improved *Agrobacterium*-mediated transformation method in *Brachypodium distachyon* for the**

**characterization of LOB-domain transcription factors.** Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress 2014, Dublin, Ireland, 2014

János Györgyey, Mária Szécsényi, Zoltán Zombori, Magdolna Gombos: **Root architecture during drought adaptation and the LOB-domain transcriptional factor family in *Brachypodium distachyon*.** Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress 2014, Dublin, Ireland, 2014.

Magdolna Gombos, Zoltán Zombori, Mária Szécsényi, Györgyi Sándor, János Györgyey: **Morphological, molecular and genetical approaches for studying organ development of *Brachypodium distachyon*.** XI. Congress of the Hungarian Society for Plant Biology, 27-29th Aug 2014, Szeged, Hungary

Magdolna Gombos, Zoltán Zombori, Gábor Horváth, Györgyi Sándor, János Györgyey: **„Genes of LOB-domain transcription factor family in *Brachypodium distachyon*”** . EMBO Conference, Signaling in plant development, 20-24. 09. 2015

János Györgyey, Zoltán Zombori, Magdolna Gombos, Mária Szécsényi: **„Root architecture during drought adaptation in *Brachypodium distachyon*”** .EMBO Conference, Signaling in plant development, 20-24. 09. 2015

Magdolna Gombos, Zoltán Zombori, Gábor Horváth, Mária Szécsényi, Györgyi Sándor, Hajnalka Kovács, János Györgyey: **LBD gene family members exhibit highly diverse spatial transcriptional profiles in *Brachypodium distachyon*.** PLANT BIOLOGY EUROPE EPSO/FESPB 2016 CONGRESS, PRAGUE

## Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Gombos Magdolna Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

Gombos, M., Zombori, Z., Szécsényi, M., Sándor, G., Kovács, H., & Györgyey, J. (2017). **Characterization of the LBD gene family in Brachypodium: a phylogenetic and transcriptional study.** Plant Cell Reports, 36(1), 61-79.

Szeged, 2017. szeptember 12.

---

Dr. Györgyey János  
Tudományos főmunkatárs  
MTA-SZBK, Növénybiológiai Intézet

Zombori, Z., Facskó, L., Gombos, M., Szécsényi, M., Sándor, G. & Györgyey, J. (2017). **Development and optimization of an efficient Agrobacterium-mediated transformation method in Brachypodium distachyon.** Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, (submitted)

Szeged, 2017. szeptember 12.

---

Zombori Zoltán  
Ügyvivő szakértő  
MTA-SZBK, Növénybiológiai Intézet