

KLOROPLASZTISZGÉN-ÁTVITEL MAGASABBRENDŰ NÖVÉNYEKBEN

Dr. Medgyesy Péter



Ph.D. tézisek

Szegedi Biológiai Központ

Szeged

1999

BEVEZETÉS

A növényi sejt sok szempontból legfontosabb alkotórészei a plasztiszok. A plasztiszok saját DNS-sel rendelkeznek, ezért tulajdonságaik öröklődő módon megváltoztathatóak. A plasztiszgenom DNS-tartalma csupán töredéke a sejtmagénak, mégis elegendő információt hordoz ahhoz, hogy biofizikusok, biokémikusok, genetikusok és növénynemesítők számára is kihívást jelentsen. Ezt csak részben magyarázza az, hogy a kloroplasztisz a fotoszintézis központja. A plasztiszokban történik (legalább részben) számos alapvető anyagcseretermék (aminosavak, nukleotidok, vitaminok, zsírsavak) bioszintézise. A sejtszerveződés mechanizmusa és evolúciója szempontjából különösen érdekes, hogy a plasztiszok fehérjéinek többsége a sejtmagban íródik át. A sejtplazmából érkező, valamint magában a plasztiszban képződő plasztiszfehérjék összehangolt termelődése és finoman szabályozott együttműködése, ill. összeépülése a sejtszerveződés egyik legizgalmasabb és egyben legkevésbé felderített területe. Mezőgazdasági szempontból nézve a kloroplasztiszoknak elsősorban a fényenergia megkötése miatt van szerepük a termésprodukciónak meghatározásában. Plasztiszgének mutációja okozza a fotoszintézisgátló herbicidekkel (pl. atrazin), valamint bizonyos gombatoxinokkal (pl. *Alternaria tenuis* tentoxinja) szembeni rezisztenciát. Egyre több adat bizonyítja a plasztiszok lényeges szerepét a hő- és hidegtűrésben is. Mindezek alapján a plasztiszok genetikai módosítása számos alapkutató és növénynemesítési cél eléréséhez nélkülözhetetlen. Hagyományos módszerekkel azonban a plasztiszok genetikai átalakítása nem megvalósítható, mert a legtöbb növényfajban csak anyai úton öröklődnek, és azokban a

növényfajokban sem történik köztük genetikai rekombináció, ahol a szülői plasztiszok keverednek keresztezéskor.

ELŐZMÉNYEK

A plasztiszgenetika fejlődében döntő jelentőségű volt a sejt- és szövettenyésztési technikák kifejlesztése. Lehetővé vált különféle mutánsok hatékony előállítása, és mesterséges táptalajon fotoszintézisre képtelen növényeket is fenn lehetett tartani. Sejtfal nélküli testi sejtekből (hártyássejtekből) megfelelő tápközegben sejtkolóniákat, azokból pedig újra teljes növényeket lehetett előállítani. A hártyássejtek kémiai, ill. fizikai módszerekkel történő fúziójával különböző növényfajok sejtorganellumait lehetett összekeverni. Az így előállított citoplazmás hibrid (cibrid) sejtek osztódásakor gyakran bizonyult a szülői sejtmagok és sejtorganellumok véletlenszerű szétválása, mely új sejtmag-plasztisz kombinációjú növények előállítását is lehetővé tette. A hetvenes években a Szegedi Biológiai Központban Maliga Pál csoportjának sikerült olyan plasztiszmutánsokat előállítani, melyek sejtenyésztésben jól szelektálható genetikai bélyeget (antibiotikumrezisztenciát) hordoztak. A mutáns sejtenyészetek, ill. csíranövények zöldülőképesek maradtak az antibiotikum jelenlétében, míg a vad típusúak kifehéredtek. Kiderült, hogy plasztiszok növényfajok közötti átvitele igen hatékonyan megvalósítható, ha a sejtplazmadonor növény antibiotikumrezisztens plasztiszokat tartalmaz, és sejtfúzió után a sejtek tenyésztése antibiotikum jelenlétében történik. A rezisztens (zöld) sejtkolóniákból ilyen körülmények között előállított növények gyakorlatilag csak a sejtplazmadonor szülő plasztiszait

tartalmazták. Irányított plasztiszátvitelt először két dohányfaj (*Nicotiana tabacum* és *N. sylvestris*) között sikerült elérni, sztreptomycinrezisztenciára való szelekció és a sejtfüzióban részt nem vett hátyássejtek kémiai inaktiválásának kombinációjával (Medgyesy és mtsai, 1980). E munka volt egyetemi doktori dolgozatom témája. A következőkben tézisszerűen foglalom össze a plasztiszok molekuláris és sejtgenetikája terén azóta elért eredményeimet.

EREDMÉNYEK

1. Plasztiszok sejtfüzióval történő átvitele olyan növényfajok között lehetséges, melyek rendszertanilag mérsékelt távolságban vannak egymástól

A plasztisz-DNS-re jellemző a törzsfajlódás során megőrződött genomösszetétel, génelrendeződés és nukleotidsorrend. A plasztiszok tehát általában hasonló génkészletet tartalmaznak rendszertanilag távoli növényfajokban. A plasztisz-DNS-re a nukleotid-sorrendet tekintve is jellemző a lassú változás. Ugyanakkor a plasztiszok fehérjéinek nagyrésze a sejtmagban íródik át, és a sejtplazmában történő szintézis után kerül a plasztiszokba. A plasztiszok (és az egész sejt) hatékony működésének feltétele a közös fehérjegyűteseket alkotó, de különböző genomokban átíródó fehérjék összehangolt szintézise, célirányos szállítása és pontos összeépülése. A szabályozás bonyolultságát fokozza, hogy annak finoman kell alkalmazkodnia a növény fejlődése és a környezeti hatások által megkövetelt igényekhez is. Mindezek alapján nehezen volt megítélhető, hogy a plasztiszok

sejtfúzió alapuló irányított átvitele mennyire széleskörűen használható. Kísérleteinkben a burgonyafélék családján belül különböző rendszertani távolságban lévő növényfajok között próbáltunk meg plasztiszátvitelt elérni. A donor plasztiszok szelekcióját antibiotikumrezisztenciájuk vagy egyszerű zöldülőkéességük alapján érték el, mely utóbbi esetben a sejtmagdonor növényfaj albinó plasztiszmutánsát használtuk (Medgyesy és mtsai, 1985a). A plasztiszdonor növényfaj sejtmagjának kizárását a cibrid sejtekből úgy érték el, hogy e hátyássejteket sejtfúzió előtt a kromoszómákat erősen károsító mértékben besugároztuk. *N. tabacum* és az ugyanabba az alcsaládba, de másik nemzetségcsoportba tartozó *Salpiglossis sinuata* között mindkét irányban lehetett plasztiszátvitelt elérni, és az új sejtmag-plasztisz kombinációjú növények normális zöldülési és növekedési képességet mutattak (Thanh és mtsai, 1988). Ugyanezen munka során *N. tabacum* és a másik alcsaládba tartozó *Solanum nigrum* között is megpróbáltunk plasztiszátvitelt elérni, azonban nem sikerült zöld sejtkolóniákat kapnunk a sejtfúziókból származó tenyészetekben. Nem közölt, későbbi eredményeink szerint e távoli kombinációban is lehet cibrid növényeket előállítani, de ezek gyengén növő, zöldülésképtelen növényké, melyek a két faj sejtmagja és plasztiszai között fellépő nagyfokú összeférhetetlenséget bizonyítják.

2. Plasztiszok sejtfúziót követő genetikai rekombinációjával a plasztiszgenom részleges átvitele érhető el, rendszertanilag távoli növényfajok között is

A hátyássejtek egyesítésével létrehozott sejtekben a két szülő plasztiszai között

létrejöhet véletlenszerű összeolvadás, amit DNS-kicserélődés követhet. Az így létrejött DNS-molekulák, ill. az ezeket tartalmazó plasztiszok a sejtosztódások során a véletlenszerű szétválás szabályait követik, ezért elvileg lehetséges volt olyan növények előállítása, melyek minden sejtje genetikai rekombinációval átalakított plasztiszok azonos populációját tartalmazza. Kísérletünk során két dohányfaj, *N. tabacum* és *N. plumbaginifolia* plasztiszmutánsait használtuk. Az *N. tabacum* mutáns sztreptomycin- és tentoxinrezisztens, ugyanakkor albinó volt. Az *N. plumbaginifolia* mutáns zöldülőképes plasztiszai linkomicinrezisztensek voltak. A sejtfüzió után sztreptomycin jelenlétében szelektált zöldülőképes növények között egy sejtmagi hibridet találtunk. E növény sztreptomycinrezisztensnek, ugyanakkor tentoxin- és linkomicinszenzitívnek bizonyult, vagyis az egyik, ill. a másik szülő plasztiszaira jellemző két-két genetikai bélyeget együttesen tartalmazta. Restrikciós endonukleázokkal nyert plasztisz-DNS-fragmentumok mintázata alapján kimutatható volt, hogy a rekombináns plasztiszgenom mozaikszerűen épült össze a szülői plasztiszok DNS-szakaszaiból (Medgyesy és mtsai, 1985b; Medgyesy, 1990). Genetikai rekombináció révén részleges genomátvitelt tudtunk elérni rendszertanilag távoli növényfajok plasztiszai között is. Ebben a kísérletben albinó *N. tabacum* plasztiszmutánt és zöldülőképes *S. tuberosum* növényt használtunk, mely utóbbi hártássejtjeit fúzió előtt besugároztuk. A kísérlet során sikerült olyan zöldülőképes dohánynövényt előállítanunk (Thanh és Medgyesy, 1989; Medgyesy, 1994), melynek plasztisz-DNS-e a dohány és a burgonya plasztiszgenomból származó részek stabil mozaikjából állt („dohagonya” plasztiszgenom). A plasztiszrekombináns dohánynövény növekedése és zöldülőképessége teljesen normális volt, bizonyítva, hogy plasztiszok közötti genetikai rekombinációval

korlátozott génátvitel érhető el olyan növényfajok között is, amelyek között a teljes plasztiszgenom átvitele, ill. kicserélése nem lehetséges. Plasztiszrekombinánsok előállításában a szigorú sejtszintű szelekció bizonyult kulcsfontosságúnak (Malone és mtsai, 1992).

3. Plasztiszok közvetlen genetikai transzformációja hártássejtek egyszerű kémiai kezelésén alapuló DNS-felvétellel is elérhető

A teljes plasztiszgenom rekombinációján alapuló génátvitel hatékonyságát csökkenti, hogy ilyenkor számos, véletlenszerű rekombinációs esemény történik a plasztiszgenom teljes hosszában. A DNS-kicserélődések véletlenszerűsége következtében tehát a génátvitel mértéke nem irányítható. A túl nagy számú plasztiszgén átvitele például a dohagonya plasztiszrekombinánsban nagyon megnehezíti a sejtmag-plasztisz együttműködésben döntő szerepet játszó gének azonosítását. A probléma megoldását a plasztiszok közvetlen genetikai átalakítása jelenti. Ennek leghatékonyabb módja az, amikor egy meghatározott gén homológ rekombinációval módosított vagy működésképtelen változatra cserélhető. Ez a megközelítés az egysejtű-egyplasztiszos zöldalgákban biolisztikus transzformációs módszerrel igen eredményesen működik. Az ún. "génpuska" használatán alapuló módszer azonban a soksejtű-sokplasztiszos magasabbrendű növényekben számos elvi és technikai ok miatt kevésbé hatékony, és a beruházási igénye is jelentős. Célunk az volt, hogy plasztisztranszformációt lehessen elérni hártássejtek egyszerű, kémiai kezelésén alapuló DNS-felvételével, mely lehetővé tenné egysejteredetű plasztisztranszformánsok hatékony sejtszintű szelekcióját.

Kísérletünkben egy olyan klónozott plasztisz-DNS-szakaszt használtunk, mely egy mutáns, 16 S üledései állandóval jellemzett riboszomális RNS-gént tartalmazott. A génben két pontmutáció sztreptomycin-, ill. szpektinomycinrezisztenciát okozott. Az egy *N. tabacum* plasztiszmutánsból származó klónozott DNS-szakaszt polietilénlikolos kezeléssel juttattuk be *N. plumbaginifolia* hártýássejtjeibe. A kettős rezisztenciájuk alapján szelektált növények molekuláris analízise is bizonyította, hogy a hártýássejtbe bejuttatott transzformációs vektor a plasztiszokba is bejutott, és a rezisztenciát hordozó plasztisz-DNS-szakasz stabilan beépült a vad típusú plasztisz-DNS-be (O'Neill és mtsai, 1993). A közvetlen plasztisztranszformáció figyelemre méltó sajátossága, hogy a plasztiszgének beépülése mindig hasonló nukleotid-sorrendű szakaszok közötti, helyspecifikus DNS-kicserélődéssel történik. Ez lehetővé teszi az egyes plasztiszgének nagy hatékonyságú, célzott átalakítását.

4. A nem teljesen homológ (homeológ) DNS-sel történő plasztisz-DNS-transzformáció hatékony, és többszörös rekombináción keresztül történik

A szintestek genetikai transzformációja magasabb rendű növényekben egyre inkább rutineljárássá válik, mégis nagyon kevés adat van a transzformáció során lejátszódó DNS-beépülés sajátosságairól. A szakirodalomban eddig megjelent plasztisztranszformációs kísérletekben a bevitt és a transzformált plasztisz-DNS-ek teljes homológiát mutattak, és a beépülés helyspecifikusan, homológ rekombinációval történt. Ez akkor is igaz volt, amikor idegen gént vittek be, ui.

ezekben az esetekben homológ határoló szakaszokat használtak, tehát a tényleges rekombináció teljesen homológ szakaszok között történt. Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy magasabb rendű növényekben részlegesen homológ (homeológ) plasztisz-DNS használata hogyan befolyásolja a DNS-integrációt. A pSSH1 jelű plasztisztranszformációs vektor egy *Solanum nigrum* (fekete csucor) plasztiszmutánsból származó, 7,8 kbp hosszúságú plasztisz-DNS-szakaszt hordoz. Ezen DNS-szakasz nukleotidsorrendje, a szelektálható szpektinomycin- és sztreptomycinrezisztenciát okozó mutációk mellett, összesen 2%-nyi fajspecifikus eltérést mutat a *Nicotiana tabacum* (közönséges dohány) megfelelő plasztisz-DNS-szakaszáéval összehasonlítva. Ezt a részlegesen homológ plasztisztranszformációs vektort dohány-hártyássejtekbe (protoplasztokba) vittük be polietilénglikolos kezeléssel. A feltételezett plasztisztranszformáns sejtkolóniákat szpektinomycinrezisztenciájuk alapján izoláltuk, majd a regenerált növényeket sztreptomycinrezisztenciájuk és a plasztisz-DNS-ük restrikciós-fragmentmintázata alapján azonosítottuk. Meglepő módon a homeológ *Solanum*-plasztisz-DNS-sel történő transzformáció gyakorisága (átlagosan egy plasztisztranszformáns 10^4 sejtkolónia között) nagyon hasonló volt a homológ plasztisztranszformációs kísérletekben kapott gyakoriságokhoz. Tizenegy transzformáns növény plasztisz-DNS-ét nukleotidszekvencia-analízissel vizsgáltuk. Összesen 14, a donor DNS-re jellemző molekuláris marker (deléció, inszerció, pontmutáció) integrációját vizsgáltuk meg mindegyik plasztisztranszformánsban. Meglepő módon azt mutattuk ki, hogy a transzformánsok 70%-ában a donor DNS helyspecifikus beépülése számos belső rekombinációs esemény közvetítésével játszódott le, vagyis a DNS-integráció mozaikszerűen történt (Kavanagh és mtsai, 1999). Más genetikai

rendszerekben a DNS-szakaszok nukleotidsorrendjének 1%-os eltérése a transzformáció, ill. rekombináció hatékonyságát 10-100-szorosan csökkenti, és a homeológ DNS-szakaszok leggyakrabban egységes darabként épülnek be. A homeológ rekombináció gátlását ezen esetekben egy speciális hibajavító rekombinációs rendszer (*mismatch repair system*) működése okozza. Ezen eredmények fényében a magasabb rendű növények kloroplasztiszaiban a DNS-rekombináció általunk kimutatott módja egyedülállónak tűnik, melynek egyik lehetséges magyarázata az, hogy a citoplazmás organellumokra jellemző anyai öröklődés miatt a növényi kloroplasztiszoknak nincs szexuális életük. Mivel a plasztiszgenom integritását nem veszélyezteti eltérő nukleotidsorrendű DNS-ekkel való rekombináció, feltehetően az ezt kivédendő speciális rendszer az evolúció során leépült. Ennek következtében a mesterségesen bevitt homeológ DNS beépülése hatékonyan, kizárólag a RecA-típusú homológ rekombinációs rendszer hatása alatt történik.

5. Korszerű magyar nyelvű szakirodalom

Elkészítettem az első magyar nyelvű, végzős hallgatóknak, ill. doktorandusoknak szóló, a plasztiszok és a mitokondriumok molekuláris biológiáját részletesen ismertető leírást (Medgyesy, 1999). E munka során számottevő erőfeszítéseket tettem a magyar nyelv, mint „második szakmai nyelv” művelésére, következetesen magyarra fordítva a széleskörűen használt laborszlenget, ill. a magyarul ragozott angol és más idegen szavakat. Jelenleg a plasztiszok és a mitokondriumok klasszikus és sejtenetikája tárgyában készítek hasonló könyvfejezetet.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Medgyesy, P., Menczel, L. and Maliga, P. (1980) The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris*, and isolation of their somatic hybrids. Mol. Gen. Genet. 179: 693-698
2. Medgyesy, P., Fejes, E. and Maliga, P. (1985a) Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6960-6964
3. Medgyesy, P., Golling, R. and Nagy, F. (1985b) A light-sensitive recipient for the effective transfer of chloroplast and mitochondrial traits by protoplast fusion in *Nicotiana*. Theor. Appl. Genet. 70: 590-594
4. Cséplő, A., Medgyesy, P., Hideg, E., Demeter, S., Márton, L. and Maliga, P. (1985) Triazine-resistant *Nicotiana* mutants from photomixotrophic cell cultures. Mol. Gen. Genet. 200: 508-510
5. Cséplő, A. and Medgyesy, P. (1986) Characteristic symptoms of photosynthesis inhibition by herbicides are expressed in photomixotrophic tissue cultures of *Nicotiana*. Planta 168: 24-28

6. Medgyesy, P., Páy, A. and Márton, L. (1986) Transmission of paternal chloroplasts in *Nicotiana*. Mol. Gen. Genet. 204: 195-198
7. Purnhauser, L., Medgyesy, P., Czakó, M., Dix, P.J. and Márton, L. (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Rep. 6: 1-4
8. Thanh, N.D., Páy, A., Smith, M.A., Medgyesy, P. and Márton, L. (1988) Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata*. Mol. Gen. Genet. 213: 186-199
9. Thanh, N.D. and Medgyesy, P. (1989) Limited plastid gene transfer by recombination overcomes plastome-genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*. Plant Mol. Biol. 12: 87-93
10. Medgyesy, P. (1990) Selection and analysis of cytoplasmic hybrids. p.287-316. In: Dix, P.J. (ed.) Plant cell line selection. VCH Publ. Ltd., Weinheim-Basel-Cambridge-New York
11. Malone, R., Horváth, G.V., Cséplő, A., Búzás, B., Dix, P.J. and Medgyesy, P. (1992) Impact of stringency of cell selection on plastid segregation in protoplast fusion derived *Nicotiana* regenerates. Theor. Appl. Genet. 84: 866-873

12. Cséplő, A., Eigel, I., Horváth, G.V., Medgyesy, P., Herrmann, R.G. and Koop, H.-U. (1993) Subcellular location of lincomycin resistance in *Nicotiana* mutants. Mol. Gen. Genet. 236: 163-170
13. O'Neill, C., Horváth, G.V., Horváth, E., Dix, P.J. and Medgyesy, P. (1993) Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. Plant J. 3: 729-738
14. Medgyesy, P. (1994) Cybrids - Transfer of chloroplast traits through protoplast fusion between sexually incompatible Solanaceae species. p. 72-85. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
15. Dix, P.J., Thanh, N.D., Kavanagh, T.A. and Medgyesy, P. (1995) Integration of *Solanum* DNA into the *Nicotiana* plastome through PEG-mediated transformation of protoplasts. p. 297-302. In: Terzi, M., Cella, R. and Falavigna, A. (eds) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publ., Dordrecht
16. Cournac, L., Guedeney, G., Joet, T., Rumeau, D., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Horváth, E.M., Medgyesy, P. and Peltier, G. (1988) Non-photochemical reduction of intersystem electron carriers in chloroplasts of higher plants and algae. p. 1877-1882. In: Garab G. (ed.) Photosynthesis: Mechanism and Effects. Kluwer Academic Publ., Dordrecht

17. Peter, S., Spang, O., Medgyesy, P. and Schäfer, C. (1999) Consequences of intergeneric chloroplast transfers on photosynthesis, light acclimation and stress sensitivity. *Austr. J. Plant Physiol.* 26: 171-177
18. Kavanagh, T.A., Thanh, N.D., Lao, N.T., McGrath, N., Peter, S.O., Horváth, E.M., Dix, P.J. and Medgyesy, P. (1999) Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* (nyomtatás alatt)
19. Medgyesy P. (1999) A szintestek és a mitokondriumok génállománya, és génműködésük többszintű szabályozása. In: Balázs E. és Dudits D. (szerk.) *Molekuláris növénybiológia*. Akadémiai Kiadó, Budapest (nyomtatás alatt)