

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Pályamunka lezárásának dátuma: 2014. november 20.

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

és

SZBK Növénybiológiai Intézet

A Retinoblasztoma tumorszupresszor (RBR) és az E2FB transzkripciós faktor szerepe a sejtosztódás szabályozásában a fejlődő Arabidopsis növényben

ŐSZI ERIKA

Biológus MSc, I. évfolyam

Témavezető

Dr. Magyar Zoltán

Belső konzulens

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Rövidítések	3
1. Bevezetés	5
1.1. A növényi sejtosztódás molekuláris szabályozása.....	5
1.2. Az <i>Arabidopsis</i> E2F-RBR modell.....	6
2. Célkitűzés.....	11
3. Anyagok és módszerek	12
3.1. Kísérleti növények in vitro kultúrák	12
3.2. Az RBR funkciót gátló specifikus mikroRNS tervezése.....	12
3.3. Mikroszkópia–fenotípusos vizsgálatok, propidium-jodid festés, GFP és CFP expressziós kísérletek a gyökéren.....	13
3.4. Lugol festés.....	13
3.5. Western blot és Immunoprecipitálás	14
3.6. A csirázás és a szikleveél számának statisztikai elemzése.....	15
3.7. Gravitropizmus vizsgálata.....	15
4. Eredmények	16
4.1. Az <i>Arabidopsis</i> RBR funkció gátlása mikroRNS segítségével	16
4.2. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása befolyásolja az embrionális sziklevelek számát.....	18
4.3. A 700.23/10-es transzgenikus vonalban megváltozik az új levelek sorrendje, a phyllotaxis.....	21
4.4. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása megváltoztatta a gyökerek növekedését és a gravitropikus választ.....	23
4.5. Az RBR E2FB specifikus csökkenése rendellenes gyökérmerisztémához vezet	28
5. Diskusszió	31
Összefoglalás	34
Irodalomjegyzék.....	35
Köszönetnyilvánítás	37
Függelék	38
Tételes szerzői hozzájárulás.....	40

Tartalmi összefoglaló

A növények életmódja és testfelépítése lényegesen eltér az állatokétól. A növények a fotoszintézisnek köszönhetően (a fényenergia átalakítása kémiai energiává) képesek a levegő szén-dioxidjának a megkötésére, amelynek révén elő tudják állítani a fejlődésükhöz szükséges tápanyagokat. Helyhez kötött életmódjuk miatt azonban alkalmazkodniuk kell a folyton változó környezethez; az adaptáció során lényegesen megváltozhat növekedésük mértéke és szerveik száma is. Szemben az állatokkal, a növények nemcsak az embrionális fejlődés során, hanem teljes életsiklusuk alatt is képesek új szervek létrehozására. A növényeknek ez a rendkívüli képessége a merisztémának nevezett régiónak köszönhető; a hajtás- és gyökérmerisztéma már az embrionális fejlődés során kialakul. Ezekben a merisztématikus régiókban speciális környezetbe ágyazódva helyezkednek el az őssejtek, amelyek poláris ún. aszimmetrikus osztódások révén új sejtvonalat hoznak létre, amelyekből kialakulnak az új szövetek és szervek.

A növényi sejtek sejtfallal vannak körülvéve, amelyek egymáshoz rögzítik a szomszédos sejteket. Ennek köszönhetően az új sejtek a merisztéma centrumától egyre távolabb "tolják" a korábban létrejött sejteket, mígnem elérnek egy olyan pontot, ahol átprogramozódnak: az eddig differenciálatlan állapotú sejtekből speciális funkció ellátására alkalmas, differenciált állapotú sejtek jönnek létre. A merisztémában e két állapot között egy dinamikus egyensúly jön létre. Ez az egyensúly biztosítja a növények növekedését, fejlődését. Molekuláris szempontból nézve a kulcskérdés az, hogy melyek azok a molekulák, szabályozási láncok, amelyek ennek az egyensúlynak a működését biztosítják. Bár a növények és az állatok fejlődése lényegesen eltér egymástól, úgy tűnik, hogy a differenciálatlan és a differenciált állapot közti átmenetet nagyon hasonló molekuláris folyamatok szabályozzák. Kutatásaink révén szeretnénk jobban megérteni, hogyan működik ez a szabályozási mechanizmus a növényekben.

Rövidítések

AL1	asymmetric leaves 1 gén
Cdc25:	specifikus a sejtosztódásban szerepet játszó foszfatáz (cdc jelentése: cell division cycle; mutánsok, amiket az élesztő sejtciklusának tanulmányozása során azonosítottak.)
CDK:	ciklin dependens/ függő kináz
CDS:	coding sequence; kódoló szekvencia
CFP:	cyan fluorescent protein
CKI:	ciklin dependens kináz inhibitor
Co-IP:	Co- immunprecipitacion
CycD3:	ciklin D3
CSZ:	cél szekvencia
DNS:	deoxiribonukleinsav
DP:	dimerizációs partner
E2F:	E2 vírus antigén kötő fehérje, transzkripció faktor
eFP browser:	elektronikus fluoreszcens pictograph software génexpressziós mintázatok kimutatására
G:	gap (sejtciklus két fő fázisa közti szakasz vagy "rés")
G1:	a sejtciklus DNS replikációjára felkészítő szakasz
G2:	mitózis előkészítő szakasza
GFP	green fluorescent protein
GM:	germination medium (csírázási média)
HRP:	horseradish peroxidáz konjugált ellenanyag
IAA:	indolecetsav
KRP:	Kip-related protein
M:	mitózis
MES:	4-Morpholineethanesulfonic acid sodium salt
MP:	Monopteros gén
mtsai:	munkatársai
p35S::amiRBR:	a dohánymozaik vírus 35S promótere által meghajtott az <i>Arabidopsis</i> retinoblastoma fehérje ellen mesterségesen előállított mikroRNS (artificial microRNA against RBR)

pE2FA::amiRBR1:	az E2FA promótere által kifejeztetett RBR specifikus mikroRNS
pE2FB::amiRBR1:	az E2FB promótere által kifejeztetett RBR specifikus mikroRNS
PJ:	propidium-jodid
PVDF:	polyvinylidene difluoride
QC:	a gyökér merisztéma organizátora, a nyugvó centrum
Rb:	retinoblasztóma (állati gén)
RBR:	a növényi retinoblasztóma rokon gén (retinoblastoma- related)
S fázis:	a sejtciklus DNS szintetikus fázisa
SDS-PAGE:	sodium dodecyl szulfát-polyakrylamid gél
TBST:	Tris-buffered saline with Tween
tZ:	transz- zeatin
UTR:	untranslated region/ nem transzlálódó régió
WT-Col:	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia
PIN1:	PIN-formed 1

1. Bevezetés

1.1 A növényi sejtosztódás molekuláris szabályozása

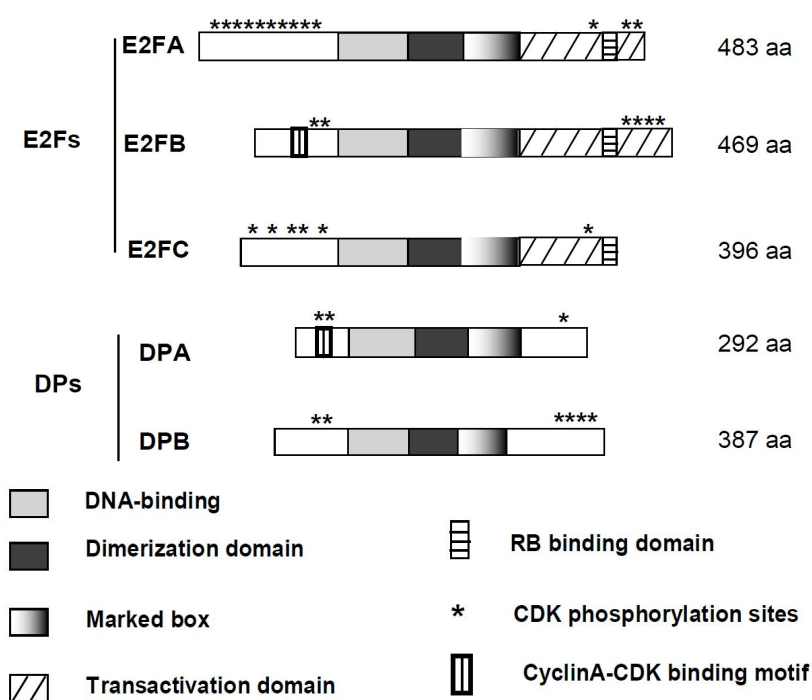
Az élet megújulási képessége a sejtosztódáson alapszik. Az eukarióta szervezetek legkisebb egységei a sejtek, osztódás révén új sejteket hoznak létre, amelyek genetikai értelemben megegyeznek az anyasejttel. A szomatikus testi sejtek mitotikusan osztódhatnak, ahol először a sejt DNS tartalma duplázódik meg (szintetikus vagy S-fázis), majd ez a megduplázódott genetikai tartalom osztódik szét egyenlő mértékben az utódsejtekbe (a kromoszómák szegregációja, a sejtciklus mitotikus vagy M-fázisában). Az osztódás lépéseit és sorrendjét szigorú molekuláris mechanizmusok szabályozzák, amelyekről kiderült, hogy evolúciósan konzerválódtak. Ezért a felfedezésért Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt és Paul M. Nurse 2001-ben Nobel díjjal lett jutalmazva (The Official Web Site of the Nobel Prize, The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2001). Mindez rámutatott arra, hogy az osztódás hibátlan működését biztosító molekuláris mechanizmusok már az ősi egysejtes állapot során kialakultak. Minden eukarióta sejtre, beleértve a növényi sejteket is univerzális modellt lehetett felállítani: az osztódás szabályozásának középpontjába egy speciális kináz molekula került, amelyet ciklin-függő kináznak neveztek el (CDK). Ez a molekula ugyanis, a sejtciklus során periodikusan megjelenő fehérjékkel, a ciklinekkel lép komplexbe. A sejtosztódás különböző fázisaiban különböző CDK-ciklin komplexek jönnek létre, amelyek foszforiláció révén irányítják a sejtciklus egyik fázisából a másikba történő átmenetét. A CDK aktivitást nemcsak a ciklin nevű fehérjék (A-, B- és D-típusú ciklinek), hanem más szabályozó molekulák is képesek befolyásolni, mint pl. a CKI molekulák (ciklin-függő kináz inhibitorok; a növényekben ilyenek a KIP-állati gátlófehérjékkel rokonságot mutató KRP fehérjék) illetve olyan kinázok és foszfatázok, amelyek a CDK molekula specifikus helyein történő foszforiláció és defoszforiláció révén változtatják meg a CDK működését (ilyen a Wee kináz és a Cdc25 foszfatáz). Az eddigi adatok alapján, a növényekben nem található Cdc25 foszfatáz, helyette olyan növény-specifikus CDK kinázok vannak (B-típusú CDK), amelyeknek a működése nem függ a Cdc25 foszfatáztól (Dewitte és Murray, 2003; Inze és De Veylder, 2006; Magyar és mtsai., 2013).

Az osztódásból történő be- és kilépés szabályozása is egy evolúciósan konzerválódott molekuláris mechanizmusra épül: ez az E2F-RBR transzkripcionális

szabályozási lánc. A *Retinoblasztoma* (RB) volt az első rákos sejtburjánzást gátló gén, amelyet emlős sejtekből izoláltak, míg az E2F (adeno vírus E2 faktor) transzkripciósfaktort az RB-vel komplexet formáló képessége alapján azonosították. A sejtosztódás szabályozásában résztvevő gének kifejeződését az E2F aktiválja, míg az RB gátolja, mégpedig az E2F-hez kapcsolódva. Az RB sejtosztódást gátló funkcióját a ciklin-függő protein kinázok (CDK) semlegesítik, amelyeknek az aktivitása sejtosztódás specifikus. Ez az egyszerű ún. klasszikus E2F-RB modell az utóbbi évek kutatásai alapján lényegesen komplexebbé vált; az E2F-RB egy olyan transzkripciósszabályozási rendszer, mely a sejtosztódásban szerepet játszó gének mellett a differenciálódási géneket is képes be- illetve kikapcsolni, ezáltal a növekedés két meghatározó folyamatát koordinálni (Magyar, 2008).

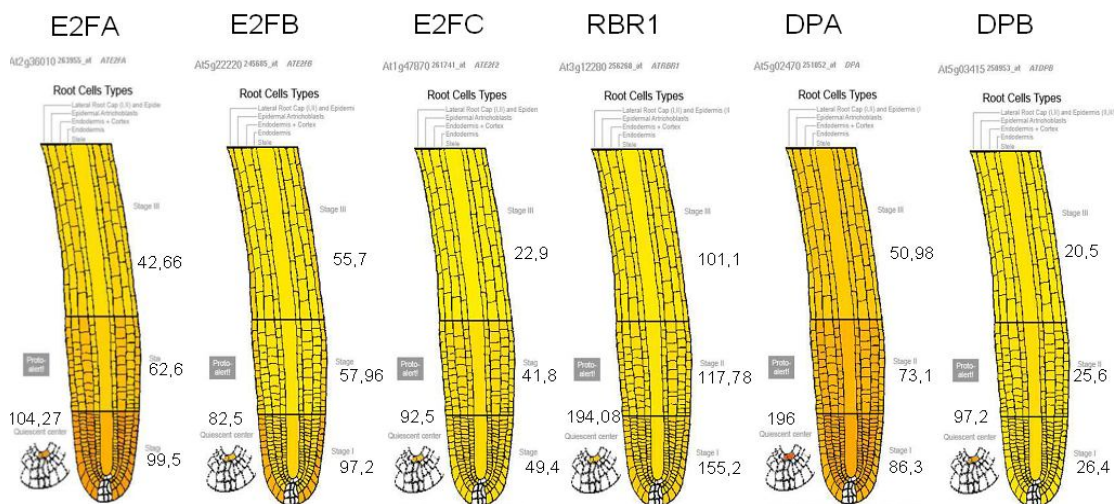
1.2. Az Arabidopsis E2F-RBR modell

Az E2F-RB szabályozási mechanizmusa meglepően jól konzerválódott a növényekben is: az állati E2F és RB gének megfelelőit megtalálták az egysejtű zöld algában (*Chlamydomonas reinhardtii*) és ennél magasabb szerveződési szintű növényekben is (Bisova és mtsai., 2005).



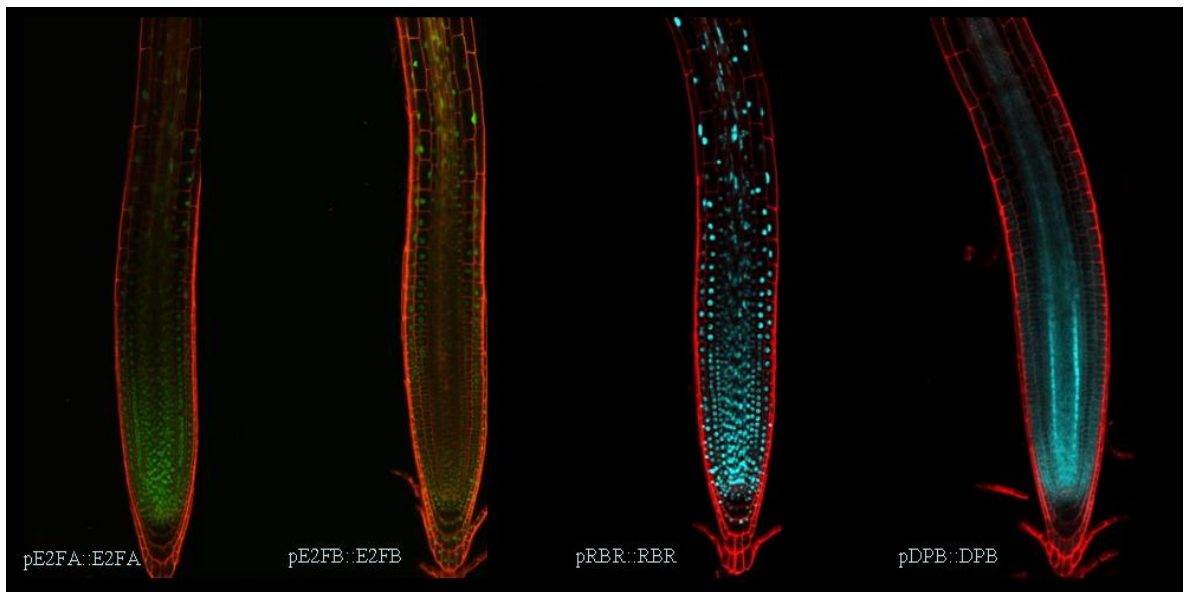
1. Ábra. *Arabidopsis* E2F és DP rokon fehérjék. Három *Arabidopsis* E2F rokon fehérje van (E2FA, E2FB és E2FC), amely rendelkezik az állati E2F transzkripciós faktorokra jellemző szerkezeti felépítéssel. Az E2F heterodimerikus komplexet formál a dimerizációs partner fehérjével (DPA és DPB), amelyek szerkezetiileg hasonlítanak az E2F faktorokra. (DNA-binding-DNS kötő régió, Dimerization domain-dimerizációs régió, Marked boks-fehérje kötő régió, Transactivation domain-transzaktivációs régió, RB binding domain-RB kötő régió, CDK phosphorylation sites-CDK foszforilációs régió, CyclinA-CDK binding motif-CyclinA-CDK kötő motívum; Magyar, 2008).

A növényi molekuláris kutatások modellnövénye az *Arabidopsis thaliana*, ahol a gének mintegy 25%-a E2F-kötő elemet tartalmaz a promóter szabályozó régióban, amely jóval nagyobb gyakoriságú, mint amit az emlős gének esetében figyeltek meg (~2%). Az *Arabidopsis*-ban három olyan E2F rokon fehérje található, amely képes az RBR fehérjével komplexet formálni (1. Ábra). Az E2F és a DP (dimerizációs partner) gének gyökérspecifikus kifejeződése között van némi különbség; az E2FA a proximális gyökér merisztéma minden sejtrétegében erősebben expresszál mint a merisztéma centrumától távolabbi sejtekben, míg az E2FB főleg a laterális gyökérsüveg sejteiben mutat magasabb expressziós értékeket (2. Ábra).



2. Ábra. Az *Arabidopsis* E2F-DP-RBR gének gyökérmerisztéma specifikus kifejeződése. Az eFP browser segítségével ábrázolt E2F-DP-RBR gének gyökérmerisztéma specifikus expressziós mintázatai (Winter és mtsai., 2007). A gyökerek jobb oldalán található értékek a külső sejtrétegre jellemző expressziós értékek (oldalsó gyökérsüveg sejtek), amelyek az affimatrix DNS-chip adataiból származnak, míg a baloldalon a quiescent center („nyugvó központ” – QC, a sárga különböző árnyalataival jelölt két sejt) sejteiben kimutatható E2F-DP-RBR expressziós adatok láthatók. A sötétebb sárga színárnyalat erősödő expressziót jelez.

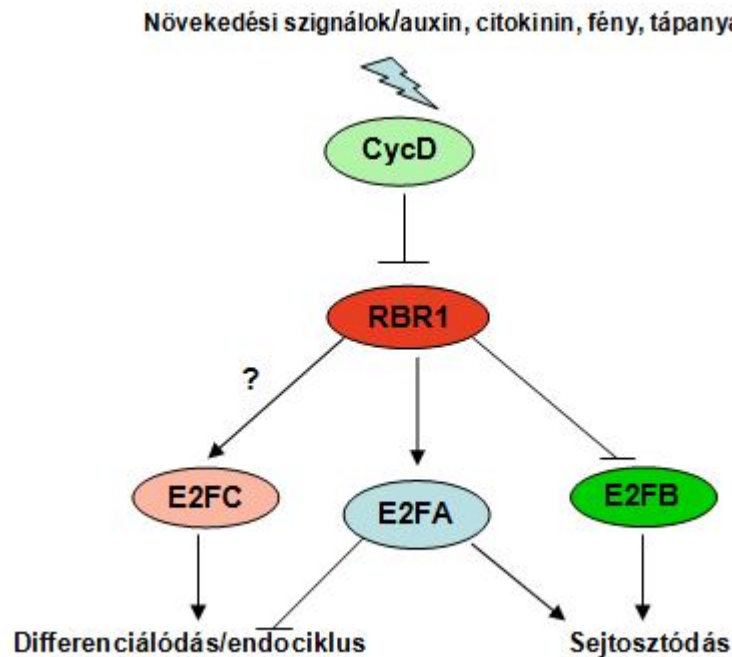
Az expressziós különbségek még nyilvánvalóbbak, amikor az E2F-DP fehérjék kifejeződését vizsgáltuk (Magyar, nem publikált eredmények – 3. Ábra). Az E2FA és az E2FB fehérjék gyökérspecifikus megjelenése egymással ellentétes. Az E2FA fehérje ott található nagyobb mennyiségben, ahol az E2FB fehérje kevésbé expresszáldott. Miután az RBR fehérje mindenhol magas szinten fejeződött ki, feltehetően nagyobb mennyiségben fordul elő az E2FA-RBR komplex a proximális merisztémában, míg az E2FB-RBR komplex mennyisége inkább a sejtosztódásból kilépő sejtekben nő meg.



3. Ábra. Az *Arabidopsis* E2FA, E2FB, RBR és DPB fehérjék gyökérmerisztéma specifikus kifejeződése. Transzgenikus *Arabidopsis* vonalak gyökércsúcsát propidium-jodid festést követően (piros szín) konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk; a kísérletben a jelzett fehérjék genomikus klónjainak GFP (zöld szín; E2FA és E2FB) vagy CFP (a GFP egy módosított kék színű változata, RBR és DPB) riporter fehérjékkel egyesített változatai a rájuk jellemző szövetekben fejeződtek ki, miután a saját szabályozó régiójuk irányította az expressziójukat. Az E2FA és E2FB fehérjék expressziója egymás komplementerei; az E2FA főleg a merisztéma centrumában, míg az E2FB inkább a merisztémából kilépő sejtekben fejeződik ki. Ugyanakkor az RBR egyenletes kifejeződő fehérje, mely így mind a két E2F transzkripciós faktor működését szabályozhatja. A DPB dimerizációs fehérje is a merisztématikus sejtekben fejeződik ki nagyobb mennyiségben, de érdekes módon nemcsak a sejtmagban fordul elő (Magyar, nem közölt adatok alapján).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *Arabidopsis* E2F transzkripciós faktoroknak és az E2F-RBR komplexeknek is egymástól eltérő funkciói is lehetnek.

Hasonlóan az állatokhoz, a sejtosztódási gének expressziójára kifejtett hatásuk alapján a növényi E2F fehérjéket aktivátor (E2FA és E2FB), és represszor (E2FC) csoportokba osztották, habár ezek a csoportosítások többnyire az E2F-ek túltermeltetési eredményeire támaszkodnak (Magyar, 2008). Az E2FA-DPA-t túltermeltető transzgenikus *Arabidopsis* növényekben ugyanakkor a teljes genomexpresszionális vizsgálat az aktiválódó gének mellett represszálódó géneket is kimutatott, ami arra utal, hogy a növényi E2F transzkripciós faktorok bizonyos gének esetében aktivátor, míg más gének esetében gátló funkciót tölthetnek be. Az E2FB-DPA heterodimer túltermeltetése, a növényi növekedési hormon, az auxin hiányában is aktiválta a sejtosztódást, míg az E2FA-DPA erre nem volt képes (Magyar és mtsai., 2005). Ez alapján az E2FB hasonló tulajdonsággal bír, mint az állati aktivátor E2F1, amely növekedési faktorok hiányában is képes aktiválni a DNS szintézist (Magyar, 2008). Az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok sejtciklus függő expressziója között is lényeges különbség van: amíg az E2FA kizárólag a sejtciklus S-fázisában fejeződik ki, addig az E2FB a későbbi sejtciklus fázisokban is jelen van (Magyar és mtsai., 2000, 2005). Az E2FB ezért nemcsak a osztódásba lépést, de az M-fázisba haladást is szabályozhatja. Ezzel összhangban, kimutattuk, hogy az E2FB szabályozza az M-fázis specifikus CDKB1;1 gén expresszióját (Magyar és mtsai., 2005; Henriques és mtsai., 2013). Az *Arabidopsis* egyetlen RB-rokon génnel rendelkezik (RBR1), amely mind a három E2F funkciót szabályozhatja (4. Ábra), de a pontos mechanizmus, valamint a komplexek növekedésben és fejlődésben betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. Az *Arabidopsis* RBR funkciója esszenciális, hiányában nem képződnek egészséges gaméták. Az RBR túltermeltetése ugyanakkor a merisztéma differenciálódásához vezet, míg az RBR funkció gátlása több összejtet eredményezett a gyökérmerisztémában (Magyar, 2008). Amikor az RBR funkciót az embrionális fejlődés után gátolták, a növények növekedése is gátlódott; az RBR hiányában több, de kisebb sejt keletkezett. Mindez megerősíti, hogy az RBR a növények esetében is központi szerepet játszik a differenciálatlan és a differenciált állapotok közti átmenet szabályozásában. Az állati Rb több mint száz fehérjével képes kölcsönhatni, nem tudjuk mi a helyzet a növényekben, de feltételezzük, hogy a növényi RBR fehérje szerkezeténél fogva hasonló tulajdonságú; szintén fontos kérdés vajon az *Arabidopsis* RBR szabályozás mennyire az E2F transzkripciós faktorokon keresztül érvényesül.



4. Ábra. Az *Arabidopsis* E2F-RBR modell. Növekedés stimuláló körülmények között (mint pl. az auxin és citokinin növekedési hormonok jelenlétében) a sejtosztódás aktiválódik. Ilyen körülmények között, a D-típusú ciklinek expressziója indukálódik, amely aktiválja az RBR kináz katalitikus alegységét (CDK). Az RBR hiperfoszforilálódik, amely ebben a formában már nem képes kötni az E2F transzkripciós faktorokat. Az *Arabidopsis* egyetlen RB rokon fehérjeje (RBR1) mind a három E2F transzkripciós faktorral képes komplexet alkotni. A jelenlegi modell szerint, az E2FB-RBR komplex kialakulását az RBR kináz (CycD-CDK) gátolja; míg az E2FA-RBR1 komplex érzéketlen a CycD-CDK komplexekre és osztódó sejtekben alakul ki, hogy gátolja azokat a géneket, amelyek a differenciálódás irányába hatnak. Az E2FC-RBR komplex szerepe kevésbé ismert, az eddigi adatok arra engednek következtetni, hogy a differenciálódást aktiválja. A növényi sejtekben a differenciálódás bekapcsolása során a mitotikus sejtciklus gyakran endociklussá alakul át, ahol a DNS replikációs fázis ismétlődik és politén kromoszómák jönnek létre (Magyar, 2005).

2. Célkitűzés

A sejtosztódás és differenciálódás közti egyensúly határozza meg a növények növekedését, szerveik méretét. Ezt az egyensúlyt a növények merisztémájában egy evolúciósan konzerválódott molekuláris mechanizmus irányítja, amely a benne résztvevő szabályozó elemekről az E2F-RBR nevet kapta. Az *Arabidopsis thaliana* mindössze egyetlen retinoblasztoma rokon génnel rendelkezik (RBR), amelynek fehérje terméke három E2F transzkripcionális szabályozó fehérjével (E2FA, E2FB és E2FC) képes komplexekbe lépni és szabályozni azok működését.

A három E2F transzkripciós faktor szerepe eltér egymástól; a jelenleg fennálló modell szerint például az E2FB RBR-mentes formája a sejtosztódást stimulálja, míg az RBR-kötött változata az osztódásból történő kilépést aktiválja. Ezzel szemben az E2FA az RBR fehérjével a merisztémában, az osztódó sejtekben lép komplexbe és gátolja azoknak a géneknek a kifejeződését, amelyek a differenciálódás megindításában játszanak szerepet. Nem pontosan ismert azonban még, hogy milyen más szerepet játszhat az RBR az E2F funkciók szabályozásában és ez hogyan befolyásolja a növények fejlődését és növekedését valamint szerveik méretét és számát. Ezért egy olyan kísérleti rendszert dolgoztunk ki, ahol az RBR funkcióját a különböző E2F-DP promóterek által irányított RBR specifikus mikroRNS segítségével gátoltuk. Miután az E2F és DP gének expressziója között különbség mutatható ki, ezért várhatóan különböző hatása lesz, ha az RBR szint specifikusan az E2FA vagy az E2FB expresszáldó sejtekben csökken. Ezt a kísérleti hipotézist alátámasztani látszanak az eddigi eredményeink. Munkám során célul tűztem ki olyan transzgenikus vonalak jellemzését, ahol az RBR funkcióját az E2FB expresszáldó sejtekben gátoltuk.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti növények és in vitro kultúrák

Kísérleteinket lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) vad típusának (ecotype Columbia) 8-as vonalán, és különböző transzgenikus mutánsain végeztük, amelyek a következők voltak: 700.23.10/1 (pE2FB::amiRBR1), a 700.23.40 (pE2FB::amiRBR1) és a p35S::amiRBR (dohánymozzaik vírus 35S promótere). A növényeket magról szaporítottuk steril körülmények között; a magokat a korábbi kísérletek során hypoval, a későbbiekben etanollal és 5%-os Domestossal sterilizáltuk, a növényeszközében hosszú nappalos körülmények között (18 órás fény szakaszt és 6 órás sötét) 24 °C-on növesztettük.

½ GM táptalaj alkotói (1 l-re vonatkoztatva): 2,2 g Murashige & Skoog por, 10 g szacharóz, 10 ml MES (Duchefa), 1000 ml-re Milli-Q vízzel kiegészíteni, 6 g agar (az érték vízszintes lemez készítése esetén értendő) vagy 8 g agar (az érték függőleges lemez készítése esetén értendő). A kiültetésre szánt növények táptalajához agar helyett Phytigel-t használtunk (4 g/l).

A táptalajok pH-ját 5,8-ra kalibráljuk kálium-hidroxid segítségével.

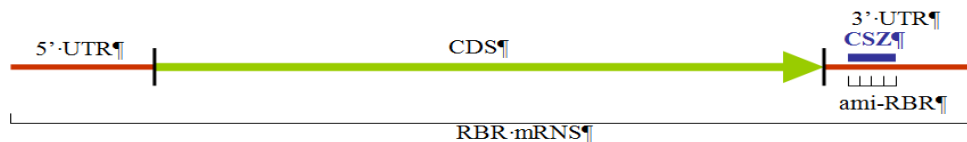
0,1 µM transz-zeatinos táptalaj alkotói: 1 l ½ GM táptalaj, 0,1 µM transz-zeatin.

10 nM-os indolecetsavas táptalaj alkotói: 1 l ½ GM táptalaj, 10 nM indolecetsav.

50 nM-os indolecetsavas táptalaj alkotói: 1 l ½ GM táptalaj, 50 nM indolecetsav.

3.2. Az RBR funkciót gátló specifikus mikroRNS tervezése

A mikroRNS stratégia grafikus ábrázolása, amely az RBR funkcióját gátolja. Az RBR specifikus mikroRNS stratégiát Alfredo Cruz-Ramirez dolgozta ki az Utrechti Egyetemen, a Prof. Ben Scheres által irányított Molekuláris Genetikai Csoportban. Az RBR specifikus amiRBR-t Horváth Beatrix klónozte a különböző E2F-DP-promóterek mögé (Utrecht Egyetem). A különböző E2F-DP promóterek klónozása Prof. Bögre László irányította csoportban történt a Royal Holloway Egyetem keretein belül.



5. Ábra. Az RBR funkciót gátló specifikus mikroRNS grafikus ábrázolása. A piros szakaszok jelzik az RBR mRNA nem transzlálódó szekvenciáit (untranslated region, 3'- and 5'UTR); zöld szakasz jelzi a kódoló szekvenciát (coding sequence, CDS), a 21 nukleotid hosszúságú mikro RNS (ami-RBR, feketével jelzett szakasz) az RBR 3' UTR régiójában helyezkedik el (célszekvencia; CSZ, lila színnel jelölve).

3.3. Mikroszkópia – fenotípusos vizsgálatok, propidium-jodid festés, GFP és CFP expressziós kísérletek a gyökéren

A csírázást és a fiatal, néhány napos növényeket sztereo mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

A propidium-jodid (PJ) a sejtek külsejét festő fluoreszcens anyag, mely az élő sejtek membránján nem tud áthatolni. Kísérleteink során 2 %-os propidium-jodid oldatot (10 µl 1 mg/ml koncentrációjú propidium-jodid oldatot raktunk 490µl vízbe) használtunk. Függőlegesen növesztett növények gyökerét (4-7 napos csíranövények) 40 µl PJ oldatba helyeztük (fedőlemezre; 22 mm x 60 mm), és fedőlemezrel (22 mm x 22 mm) befedtük. Konfokális mikroszkóp (Leica) alatt azonnal vizsgáltuk, 543 nm gerjesztés mellett, ahol a propidium-jodid emissziója 580-630 nm közé esett. A GFP 488 nm-nél gerjesztődik és az emissziója 500- 530 nm esik, míg a CFP fehérjék 426- 446 nm között gerjesztődnek és az emissziójuk 460- 500 nm közé esik.

3.4. Lugol festés

A gyökérsüveg sejtjeinek bazális részén található sztatolitok, azaz a gravitropizmusért felelős keményítő szemcsék megfestésére alkalmas módszer. A keményítő, poliszacharid révén D-glukóz alapegységekből épül fel, amely α -1-4-es kötést tartalmazó amilózt, és α -1-4 és 1-6-os kötést tartalmazó amilopektint képez, egy helikális szerkezetet biztosítva (Ádám, 2004). Klorálhidrát oldattal fixáltuk a gyökereket jégen 5-10 percig.

A lugol oldat (Sigma) jód tartalmának köszönhetően, bejut a cukor molekulák által alkotott spirál belsejébe és a jodid-ionok és a keményítő molekulák között egy elektron

donor-akceptor kölcsönhatás alakul ki, így a megfestett keményítő szemcséknek más lesz a fényelnyelési tartománya (Guttman, 2008)

3.5. Western blot és Immunoprecipitálás

A mintában adott fehérjék kimutatására, és hozzávetőleges mennyiségének meghatározására alkalmas módszer.

A növényi mintát homogenizáló pufferben (tartalmazza a proteáz inhibitorokat, valamint a foszfatáz gátlókat) feltárjuk (folyékony nitrogénben eldörzsöljük a szöveteket). A fehérje koncentrációt Bradford reagenssel, spektrofotométer segítségével 590 nm-en meghatározzuk. 95 °C-on denaturáljuk és a mintákat azonos mennyiségben visszük fel az SDS- PAGE gélre (sodium dodecyl szulfát-polyakrylamid gél). A denaturált fehérjéket gélelektroforézissel molekulásúly szerint elválasztjuk egymástól. A megfuttatott gélre PVDF membránt (Millipore) helyezünk, és a gél síkjára merőleges áram hatására átranzferáljuk a fehérjéket. A transzfert a membrán Ponceau-festéssel ellenőrizzük. A membrán szabad kötőhelyeit zsírsavmentes, 5%-os tejpor TBST oldatával telítjük, hogy elkerüljük az ellenanyagok membránhoz történő aspecifikus kötődését. A specifikus, elsődleges antitestet (anti-E2FB, anti-RBR, anti-CDKB1;1, anti-CDKA;1) megfelelő hígításban az 5%-os tej-TBST oldatban végezzük (4 °C-on és egy éjszakán át) moderált rázás mellett. A mosást követően (TBST) hozzáadjuk a második antitestet, amely az első ellen termeltetett jelölt antitest (anti-rabbit, anti-chicken és anti-mouse HRP - horseradish peroxidáz konjugált ellenanyagok). Egy óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően, a membránról a felesleges ellenanyagokat mosással eltávolítjuk (3xTBST, 10 perc). Ezt követi a kemilumineszcens szubsztrát hozzáadása (Supersignal West-Pico; Thermo Scientific vagy az Immobilon Western; Millipore), amellyel öt percig inkubáljuk a membránt. A membránra fényérzékeny filmet helyezünk. Ha mintánk tartalmazta a vizsgált fehérjét, akkor a megfelelő magasságban sávot (band) kapunk, melynek az intenzitásából következtethetünk a mennyiségére is.

Az immunoprecipitálás során specifikus ellenanyag segítségével fehérje komplexeket izoláltunk. Tíz napos csíranövények sziklevelét gyűjtöttük össze (kb. 35-50) kontroll *Arabidopsis* illetve a transzgenikus 700.23/10-es homozigóta vonalakról. A szöveteket folyékony nitrogén alatt finom porrá törtük, majd feltáró pufferben oldatba

vittük a fehérjét. Centrifugálással eltávolítottuk a sejtörmelékeket, valamint a vízben nem oldódó anyagokat. Az oldat fehérje koncentrációját a fenti módszerrel meghatároztuk. Egyenlő (kb. 350µg) mennyiségű fehérjét használtunk az immunoprecipitáláshoz; anti-E2FB ellenanyaggal 1,5 óráig inkubáltuk a fehérjét 4 °C-on körkörös forgó rolleren. Ezt követően protein-A-Sepharose-t adtunk a mintákhoz (30µl-25%-os) és még egy óráig inkubáltuk 4 °C-on. A nem kötődött fehérjét mosással eltávolítottuk, majd fehérje minta puffer hozzáadásával a kötődött fehérjét eluáltuk. 95 °C-os denaturációt követően a mintákat SDS-PAGE gélelektroforézissel megfuttattuk és szeparáltuk. Western blot analízissel vizsgáltuk a specifikus fehérjék komplexben történő előfordulását (lásd korábban) (Sigma- Aldrich, Immunoblotting (Western Blotting)).

3.6. A csírázás és a sziklevel számának statisztikai elemzése

A vad típusú és mutáns növényeket a kirakástól számított 6. napon vizsgáltuk. Mértük a csírázás hatékonyságát. Felmértük, az összes kirakott növényből mennyi csírázott, ezek közül mennyi az, amely a vad típusnál megfigyelteknek megfelelően fejlődik, mennyi abnormális, ami alatt a 0, 1 vagy 3 sziklevellel rendelkezőket értjük, majd százalékos értékelést készítettünk.

3.7. Gravitropizmus vizsgálata

A növényeket ½ GM, vagy különböző hormon (IAA és tZ) tartalmú függőleges lemezen növesztettük. A csírázástól számított 7. napon 90°-kal elforgattuk őket. 24 óra elteltével a forgatás az ellenkező irányba történt, azaz a lemezek visszakerültek az eredeti helyzetükbe. A lemezekről scanneléssel képeket készítettünk és a látottakat feldolgoztuk.

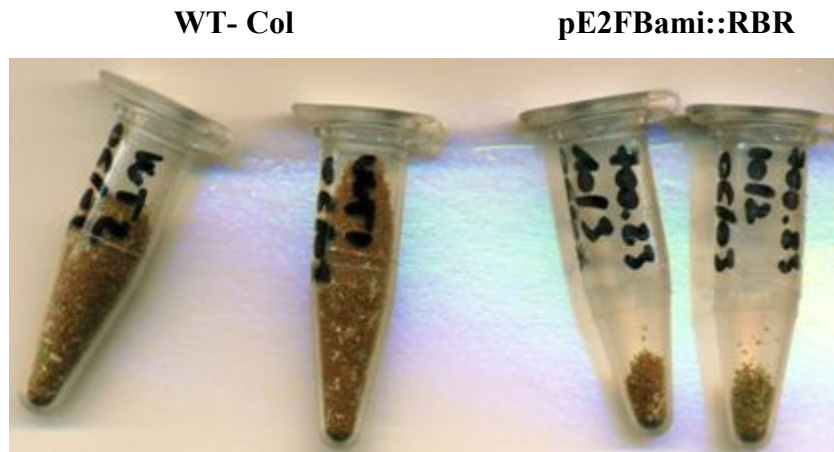
4. Eredmények

4.1. Az *Arabidopsis* RBR funkció gátlása mikroRNS segítségével

Az RBR kifejeződését gátló 21 nukleotidnyi hosszúságú mikroRNS az RBR 3' nem traszlálódó szakaszára lett tervezve (részletesen lásd anyagok és módszerek fejezet). Az Utrechti Egyetemen, Prof. Ben Scheres által vezetett Molekuláris Genetika Csoport sikeresen gátolta az RBR kifejeződését, olyan transzgenikus *Arabidopsis* növényekben, ahol az RBR specifikus mikroRNS-t a dohány mozaik vírus 35S promótere által fejeztették ki (Ramirez és mtsai., nem közölt eredmények). Ezt a mesterséges mikroRNS-t klónoztuk be a különböző E2F-DP promóter szekvenciák mögé, azzal a céllal, hogy azokban a sejtekben gátoljuk az RBR kifejeződését, ahol az E2F és DP gének expresszálódnak (E2F-DP specifikus módon). Így feltételezhetően különböző E2F-DP komplexek szabadulnak fel az RBR szabályozás alól. Az elkészült konstrukciókat *Arabidopsis* Columbia vonalba transzformáltuk vissza. A szakdolgozati munkám során elsősorban azokkal a transzgenikus *Arabidopsis* növényekkel foglalkoztam, ahol az E2FB gén promótere által termelődött RBR specifikus mikroRNS fejeződött ki (pE2FB::amiRBR). Mintegy száz független transzformáns vonalat izoláltunk. Ezek közül a transzgenikus vonalak közül, a 700.23/10-es esetében a transzgenikus növényeken olyan makroszkópikus változásokat is megfigyelhettünk, amelyeket korábban az RBR csendesítése során írtak le (gátolt növekedés, pöndörödő levelek, alacsony maghozam, korai virágzás – 6-7. Ábra, Borghi és mtsai., 2010).



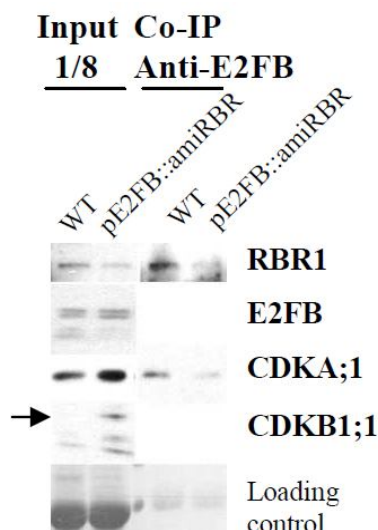
6. Ábra. Makroszkopikus változások az pE2FB::amiRBR transzgenikus növényeken. A transzgenikus növények (700.23/10/4-es és 5-ös 2. Generációs –T2- homozigóta vonalak) kisebbek, mint a hasonló korú kontroll, vad típusú növények (bal oldali ábrán két héttel a csírázást követő állapot látható). A levelek kisebbek és a levélszéleken pöndörödtek. A transzgenikus növények a kontroll növényekhez képest előbb virágoznak. A becőtermések kisebbek (jobb oldali kép) és a legtöbb esetben mag nélküliek. Ennek megfelelően a transzgenikus növények terméshozama jelentősen visszaesett (lásd következő ábra).



7. Ábra. Vad típusú *Arabidopsis* (WT-Col) és a transzgenikus pE2FB::amiRBR1 növények maghozama. Egyetlen növényről begyűjtött magokat eppendorf csövekbe raktuk; a WT-Col növények maghozama többszöröse (~10-12x) a pE2FB::amiRBR1 transzgenikus növényekének (homozigóta 700.23/10/2-3)

Annak igazolására, hogy ebben a transzgenikus *Arabidopsis* vonalban az RBR fehérje mennyisége az E2FB expresszáldó sejtekben csökkent immunológiai megközelítést alkalmaztunk. Tíz napos vad típusú és transzgenikus csíranövények szikleleveléből fehérjét izoláltunk és natív fehérje komplexeket precipitáltunk az E2FB specifikus ellenanyag segítségével (8. Ábra). Kimutattuk, hogy a transzgenikus növények sziklelevelében kevesebb RBR fehérje termelődött, mint a hasonló korú vad típusú kontrollban, ami arra utal, hogy az RBR expressziót sikeresen gátoltuk. Ráadásul, ezekben a növényekben az E2FB transzkripciós faktor csak RBR-szabad formában volt kimutatható (8. Ábra). Mindebből arra következtettünk, hogy a sziklevel E2FB expresszáldó sejtjeiben sikerült gátolnunk az RBR kifejeződését. Az RBR-mentes E2FB stimulálja az osztódást, többek között a CDKB1;1 G2-M fázis specifikus ciklin-függő kináz gén aktivációján keresztül (Magyar és mtsai., 2005). Ezzel összhangban a

CDKB1;1 fehérje megjelent a transzgenikus növényekben, míg a kontroll növényekben nem volt látható. Mindez arra utal, hogy a transzgenikus növények sziklevelében sejtosztódás aktivációja figyelhető meg egy olyan fejlődési stádiumban, amikor a sejtosztódás már normálisan gátolódott.



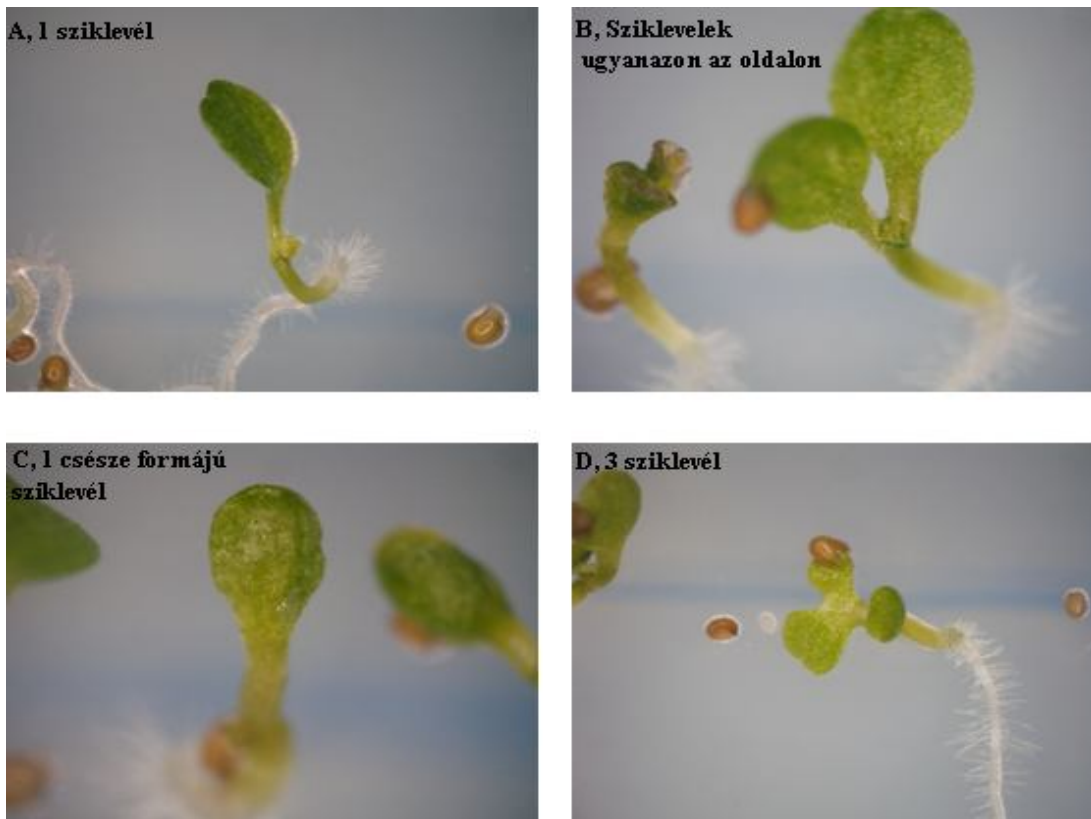
8. Ábra. Az RBR fehérje csökkenése az E2FB transzkripciós faktor aktivációjához vezetett a pE2FB::amiRBR transzgenikus *Arabidopsis* vonal sziklevelében.

Tíz napos kontroll, vad típusú és transzgenikus (pE2FB::amiRBR) csíranövények szikleveléből fehérjét tisztítottunk majd 10%-os SDS-polyacrylamid gélen (SDS-PAGE) molekulásúly szerint elválasztottuk őket (input – az ábra bal oldala). Az input mennyiség (40 µg) nyolcszorosával immunoprecipitációt végeztünk (co-IP) az E2FB elleni specifikus ellenanyag segítségével, majd a tisztított fehérje komplexeket denaturáló körülmények között SDS-PAGE módszerrel elválasztottuk (az ábra jobb oldala – Co-IP, Anti-E2FB). Az ábrán jelzett fehérjék komplexben történő előfordulását valamint az inputban található mennyiségeiket az ellenük termeltetett specifikus ellenanyagok segítségével immunoblot módszerével vizsgáltuk. A fehérje mintákat azonos koncentrációban vittük fel a gélre, amit a membránon Coomassie Brilliant Blue festéssel tettünk láthatóvá (loading control).

4.2. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása befolyásolja az embrionális sziklevelek számát

A 700.23/10-es transzgenikus vonal esetében jelentős százalékban figyelhettünk meg olyan csíranövényeket, ahol a sziklevelek száma és/vagy pozíciója eltért a normálistól (9. Ábra). A változásokat leíró statisztika segítségével jellemeztük, amelybe bevontuk a 35S::amiRBR vonalat is (Utrecht Egyetem; Prof Ben Scheres Csoportja), valamint a vad típusú kontroll *Arabidopsis* növényeket is. A három vonalhoz tartozó

magokat függőleges helyzetű lemezeken csíráztattuk; háromszoros ismétlésben, lemezenként mind a három vonalból igyekeztünk egyenlő számú magot kirakni (~20mag/vonal/lemez).



9. Ábra. Az RBR fehérje mennyiségének E2FB specifikus csökkenése megváltoztatja az embrionális levelek (sziklevelek) számát és pozícióját. Néhány napos csíranövények megváltozott számú, formájú és pozíciójú sziklevelekkel.

Két nappal a magok kirakása után sztereo mikroszkóp alatt vizsgáltuk a lemezeket és megszámláltuk a csírázó magokat. Az eredmények összefoglalását az 1. Táblázat tartalmazza. Ebben az időpontban mind a két transzgenikus vonal gyengébb csírázási képességeket mutatott, mint a kontroll, amely 100%-ban kicsírázott.

1. Táblázat. Három *Arabidopsis* vonal csírázási hatékonyságának statisztikai összehasonlító táblázata két nappal a csírázás indukcióját követően.

	p35S::amiRBR		pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)		WT-Col	
<u>összesen kirakott</u>	61	100 %	62	100 %	64	100 %
<u>Csírázó</u>	41	67,21 %	49	79,03 %	64	100 %
<u>sziklevél látható</u>	10	16,39 %	28	45,16 %	36	56,25 %
<u>Magháj megrepedt</u>	5	8,19 %	4	6,45 %	0	0 %
<u>Nem csírázó</u>	15	24,59 %	9	14,51 %	0	0 %

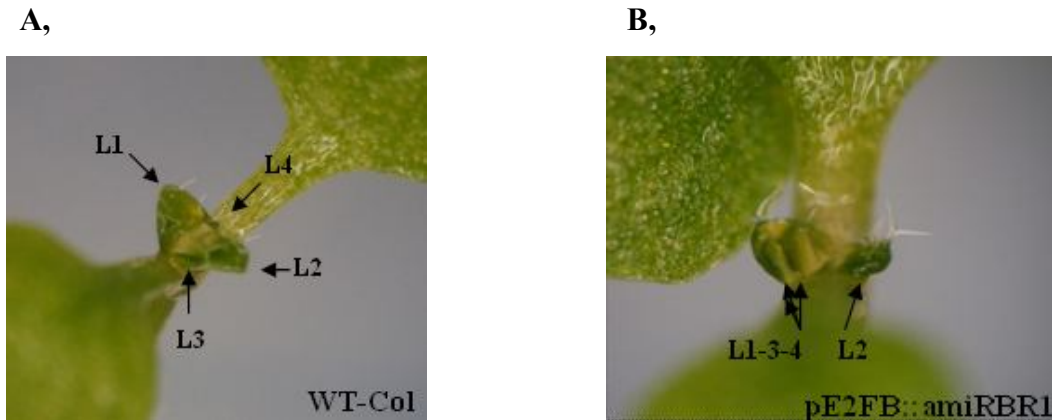
Négy nap múlva újra megvizsgáltuk a lemezeket, és a kapott adatokat a 2. Táblázatban foglaltuk össze. Mind a két transzgenikus vonalban megközelítően hasonló arányban csíráztak ki a magok (77-80 % között, csírázó + magháj megrepedt), ami gyengébb hatásfokú volt, mint a kontroll vad típusé (100%). Jelentős százalékban megváltozott a sziklevek száma az pE2FB::amiRBR vonalban, a két sziklevel mellett (56%), a leggyakoribb az egy sziklevelű csíranövény lett (~20%). Érdekes módon ez a jelenség csak erre a vonalra volt jellemző, a p35S::amiRBR vonalban sem láttunk hasonló fenotípusos változást. Hasonló eredményt kaptunk a kísérlet megismétlésekor is (nem mutatott adat). A sziklevek, vagy embrionális levelek az embrionális fejlődés globuláris stádiumában iniciálódnak, amikor a bilaterális szimmetria alakul ki, ezért ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az RBR funkció az E2FB transzkripciós faktorral együtt szabályozza az embrionális fejlődést és/vagy a bilaterális szimmetria kialakulását és a kontroll nélküli E2FB aktivitás rendellenességekhez vezet.

2. Táblázat. Három *Arabidopsis* vonal csírázási hatékonyságának és a sziklevek számának statisztikai összehasonlító táblázata hat nappal a csírázás indukcióját követően.

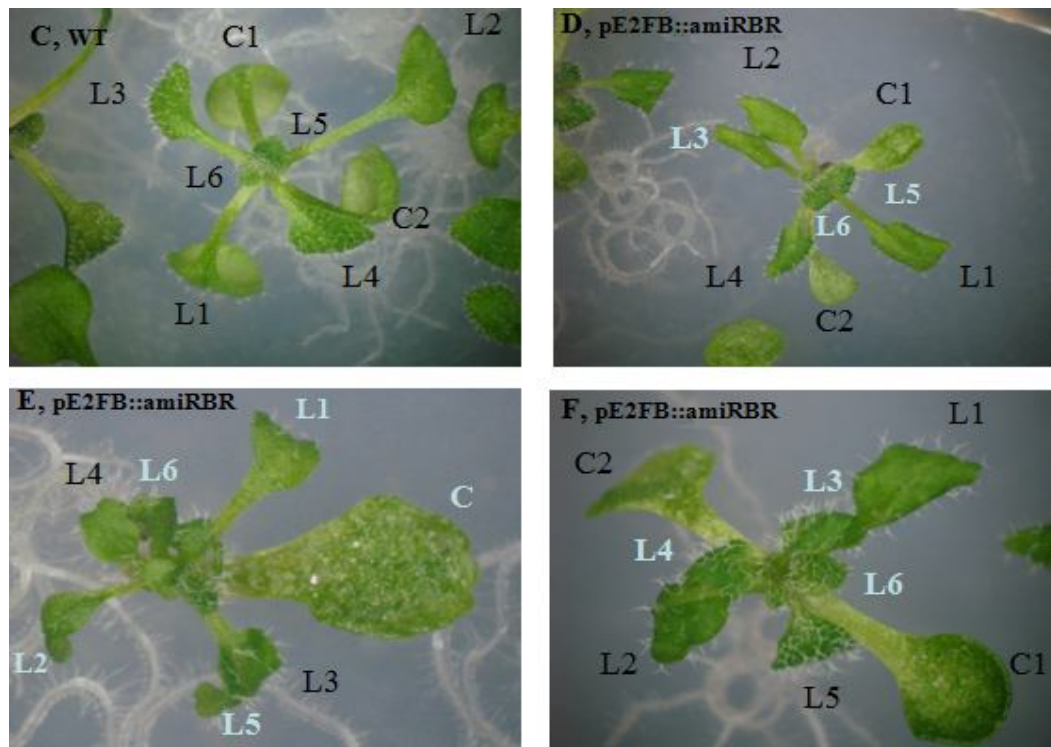
	P35S::ami RBR		pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)		WT-Col	
<u>összesen kirakott</u>	61	100 %	62	100 %	64	100 %
<u>Csírázott</u>	47	77,04 %	50	80,64 %	64	100 %
2 sziklevel	46	75,40 %	35	56,45 %	64	100 %
0 sziklevel	1	1,63 %	2	3,22 %	0	0 %
1 sziklevel	0	0 %	12	19,35 %	0	0 %
3 sziklevel	0	0 %	1	1,61 %	0	0 %
<u>Nem csírázott</u>	14	22,95 %	12	19,35 %	0	0 %

4.3. A 700.23/10-es transzgenikus vonalban megváltozik az új levelek sorrendje, a phyllotaxis

A 700.23/10 vonalban már néhány nappal a csírázást követően megfigyelhettünk olyan növényeket is, amelyek ugyan két sziklevéllal fejlődtek, de azok pozíciója eltért a kontroll növényektől, mint a 9. B Ábrán látható csiranövény is, ahol a két sziklevel nem egymással szemben fejlődött ki (mint a kontrollban – 10. A), hanem közvetlenül egymás mellett. Későbbi fejlődési stádiumokban lévő növényeknél a valódi levelek kialakulása során figyelhettünk meg hasonló jelenséget (lásd 10-11. Ábra). A levelek spirális fejlődési sorrendjét a phyllotaxis szabályozza, amely szabályos mintázatot követ. A sziklevek egymással szemben fejlődnek ki, akárcsak az első levélpár, de a sziklevekhez képest 90°-os szögben elfordulva. Az ezt követő, új levélpárok a növény tengelye körül spirálisan, egymással megközelítően 137,5°-os szöget bezáróan fejlődnek ki (ez az úgynevezett arany szög). A 11. Ábra jól szemlélteti, hogy pE2FB::amiRBR transzgenikus növények esetében az újonnan formálódó levelek pozíciója eltér a normálistól és az eddigi adataink alapján a phyllotaxis rendje random változik meg. A megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a levelek kialakulási sorrendje nemcsak az embrionális fejlődés során, de gyakorlatilag bármelyik fejlődési stádiumban eltérhet a normálistól.



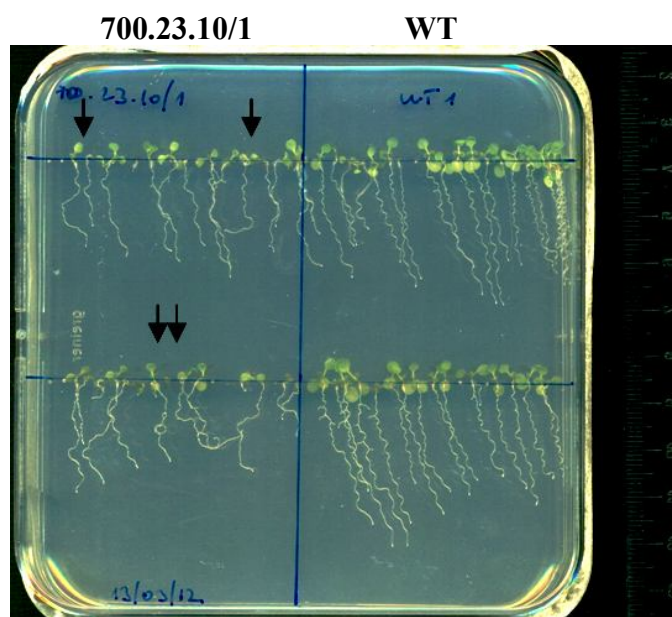
10. Ábra. Néhány napos WT-Col és pE2FB::amiRBR csíranövények. A vad típusú növényben (A) a 2. levélpár (L3-L4) egymással szemben fejlődik ki, míg a pE2FB::amiRBR vonalban (B) egymás mellett. Az ábrán nyilak jelzik a leveleket (L1-4).



11. Ábra. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása megváltoztatja az újonnan kialakuló levelek sorrendjét, a phyllotaxist. A fekete színnel írt nagy betűk a szikleveleket (C1-2) illetve a valódi leveleket (L1-2-3-4-5-6) jelzik, ahol a számok a levelek fejlődési sorrendjét mutatják. Világos színnel írt nagy betűk azokat a leveleket illetve szikleveleket jelölik, ahol nem érvényesült a phyllotaxis szabálya. A kontroll növényhez (C) képest random eltéréseket lehetett megfigyelni a transzgenikus növények levélfejlődési sorrendjében (D-F). A harmadik levél a második levél mellett fejlődött ki (D), egyetlen sziklevélnél képest rossz helyen fejlődött a következő levélpár, de az ötös és hatos levelek helyzete sem normális (E), míg egy másik esetben a 2. levélpár (L3-4) helyzete megegyezik az első levélpár helyzetével (F).

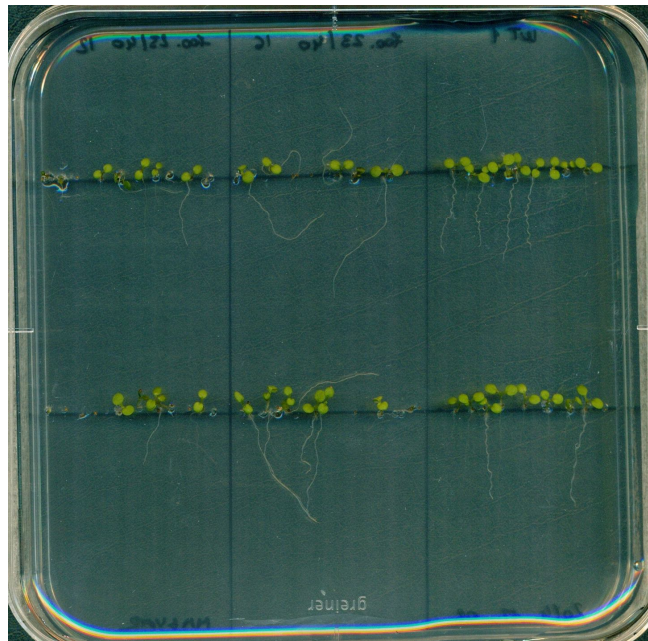
4.4. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása megváltoztatta a gyökerek növekedését és a gravitropikus válaszát

Amikor függőleges lemezen növesztettük a növényeinket, a 700.23.10-es transzgenikus vonal gyökerei jelentős mértékben rövidebbre nőttek, mint a hasonló korú vad típusú kontroll növények gyökerei (12. Ábra). Azt is megfigyeltük, hogy a transzgenikus gyökerek számos esetben kisebb kanyarokat, hurkokat írnak le növekedésük során, sőt voltak olyan gyökerek, amelyek egy bizonyos hossz elérése után vízszintesen nőttek a függőleges helyzetű lemezekben (12. Ábra- nyíllal jelzett növények). A 700.23.40-es homozigóta vonalban jelentős számban fordult elő olyan növény, amely agravitropikusan, és a gravitációval szemben teljesen az ellenkező irányba nőtt (13. Ábra). Érdekes módon ezeknek a gyökereknek a hossza nem változott a vad típusú gyökerekhez képest. Néhány esetben azonban megfigyelhettünk kisebb, retardált növekedésű gyökereket is. Mindez arra utalt, hogy az RBR szint csökkenésének a következményeképpen ezekben a növényekben a gyökerek nem vagy csak részben képesek a gravitációt követni.



12. Ábra. Az RBR funkció E2FB specifikus gátlása rövidebb gyökereket eredményezett. A képen hat napos függőlegesen növesztett csíranövények láthatóak, a lemez balfelén a transzgenikus (700.23.10/1), míg a jobb oldalán a kontroll, vad-típusú növények nőttek. Nyilak jelzik azokat a növényeket, amelyeknek a gyökerei kanyarulatokat illetve hurkokat írnak le illetve egy bizonyos hossz után vízszintesen növekedtek.

700.23.40/12 700.23.40/16 WT

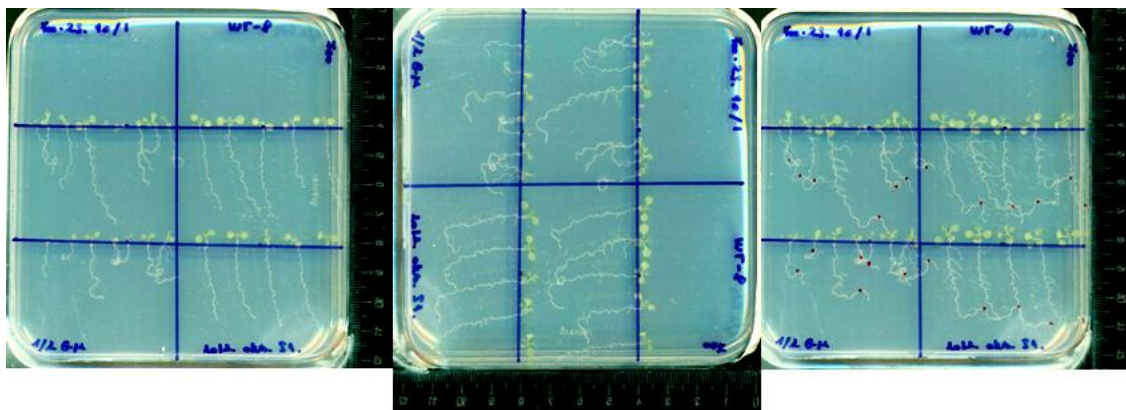


13. Ábra. 700.23.40-es transzgenikus vonalak gyökerei agravitropikus növekedést mutatnak. A kép bal oldalán és közepén (700.23.40/16) ugyan annak az pE2FB::amiRBR vonalnak (700.23.40) két homozigóta változata (700.23.40/12 és 16), míg a jobb oldalán a vad típusú *Arabidopsis Col* (WT) növények láthatóak. A csiranövényeket függőleges lemezen 6 napig növesztettük folyamatos fényviszonyok mellett.

Megvizsgáltuk, hogy a 700.23/10-es növények gyökerei milyen mértékben képesek növekedésükkel a gravitációs változásokat követni. Ezért a függőleges helyzetű lemezeket 90°-os szögben elfordítottuk, majd egy nap múlva visszafordítottuk őket az eredeti helyzetükbe (13. Ábra) és a gyökerek görbüléseiből következtettünk arra, milyen mértékben képesek válaszolni az új helyzetre. A lemezekről képeket készítettünk (lásd 13. Ábra) és a gyökereket a növekedésük alapján különböző csoportokba osztottuk. Normálisnak tekintettük azokat a növényeket, melyek 24 óra folyamán sikerült észlelniük az elforgatást és gyökérük a forgatásnak megfelelően a gravitropikus inger irányába, azaz lefelé nőtt. Visszaforgatott állapotban ez megközelítőleg 90°-os szöget bezáró gyökereket jelent (13. Ábra). Abnormálisnak definiáltuk azokat a növényeket, melyek gyökere túlfordult (több mint 105°-os szöget zárt be), kevesebbet fordult (kevesebb, mint 75°-os szöget zárt be), hurkot képezett, vagy az ingernek ellenkező irányba fordult.

Kísérletünkben megjelentek olyan növények is, melyek nem reagáltak az általunk kiváltott ingerre, ezek gyökerének növekedése stagnált, vagy az ingertől függetlenül nőtt tovább az elsődleges irányba, amelybe elindult.

Az adatok alapján megállapíthattuk, hogy az RBR funkció E2FB specifikus gátlása egyértelműen zavart okozott a növények gyökerének gravitropikus növekedésében (13. Ábra és 3. Táblázat).



14. Ábra. A 700.23/10-es transzgenikus növények csak gyenge hatékonysággal képesek követni a gravitációt. Hat napos, függőleges lemezen növesztett csíranövényeket (bal oldali kép) 90°-kal jobbra forgattunk (középső ábra) majd egy nappal később visszafordítottuk őket az eredeti helyzetükbe (jobb oldali kép; piros pötty jelzi a 90°-os forgatás utáni helyzetet). A transzgenikus gyökerek növekedése már a kiindulási lemezen is jelentős mértékben eltér a kontroll növények gyökerétől. Az elforgatott lemezekon a kontroll gyökerek jó irányba fordulnak el, míg számos mutáns gyökérnél ez nem, vagy csak nehezen sikerül (pl. ellenkező irányba kanyarodik).

A gyökerek görbülése a sejtmegnyúlástól és hosszabb távon a sejtosztódástól függ. A görbülő gyökér egyik oldalán (belső) a sejtmegnyúlás gátlódik, míg a másik oldalán (külső) aktiválódik. Az osztódás pedig sejteket hoz létre, amely szimmetrikusan, a gyökér mindkét oldalán hasonló intenzitással működik. Amennyiben ez az intenzitás nem szimmetrikus, úgy a gyökér növekedése is szabálytalanná válik, elhajlik. Ismert, hogy az *Arabidopsis* gyökerek növekedését hormonokkal befolyásolni lehet; az auxin (indolecetsav – IAA) alacsony koncentrációban sejtosztódást stimulál, míg a citokinin a differenciálódást aktiválja. Ezért az előző kísérletet úgy ismételtük meg, hogy a tápoldatba auxint (10 nM illetve 50 nM IAA) vagy citokinin (0,1 μ M transz-zeatin) raktunk. A csíranövényeket 7 napig növesztettük a hormonok jelenlétében, majd ezt követően végeztük el a már fentebb leírt forgatási kísérletet. A 3. táblázatban foglaltuk

össze az eredményeinket. Kinetin jelenlétében (0,1 μ M transz-zeatin) több mint a felére csökkent a rendellenes gravitropikusan nöövő gyökereknek a száma, és a forgatások során sem figyelhattunk meg lényeges különbséget a transzgenikus és a kontroll növények között. Az auxin (10 nM IAA) jelenlétében növesztett növények esetében ugyanakkor jelentősen megnőtt azoknak a gyökereknek a száma, ahol hét nappal a csírázást követően a gravitropikus gyökérnövekedést lehetett megfigyelni. A forgatásra is érzékenyebbek voltak ezek a gyökerek, mint a kontroll, ahol nem láttunk rendellenességet. Magasabb auxin koncentráción (50 nM IAA) azonban már nem romlott tovább a helyzet, sőt a transzgenikus vonal gyökerei a hormonmentes körülményekkel nagyon hasonló görbülési értékeket mutattak. A gravitropikus fenotípus oka lehet a gyökérben szintetizált keményítő szemcsék hiánya is. Ezek a differenciált columella sejtekben alakulnak ki, amelyek fontos szerepet játszanak a gravitáció érzékelésében és a gravitropikus válasz kialakításában is. Lugol festéssel megvizsgáltuk, vajon a mutáns növényekben is kimutathatóak-e a keményítő szemcsék. Az eredmények alapján megállapíthattuk (14. Ábra), hogy ezek kialakulása a transzgenikus növények gyökerében is megfigyelhetőek, feltehetően tehát nem ez az oka a mutáns növényben megfigyelt gravitropikus hiányosságoknak. Ezeknek az adatoknak az alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az RBR E2FB specifikus gátlása a gyökér merisztémában az osztódás mértékét, feltehetően irányát és térbeli megoszlását befolyásolja, és így a gyökerek növekedése szabálytalanná válik, amely a gravitropikus válaszban is megnyilvánul.



15. Ábra. Az RBR E2FB specifikus csökkenése nem gátolja a keményítő szemcsék kialakulását a gyökérsüvegben. Néhány napos függőlegesen növesztett csíranövény gyökerét Lugol-festéssel megfestettünk, majd mikroszkóp (Cell-R) alatt megvizsgáltuk őket. A sötétbarna elszíneződés a keményítő szemcsék jelenlétére utal.

3. Táblázat. 1/2 GM-en nevelt WT-Col és pE2FB::amiRBR vonalak gravitropikus érzékenységének statisztikai összehasonlító táblázata.

	pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)			WT-Col		
	Kiindulás	90°-os forgatás	vissza- forgatás	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás
Normális	51,85 %	81,48 %	74,07 %	100 %	94,11 %	94,11 %
Abnormális	48,14 %	14,81 %	18,51 %	-	5,88 %	-
Nem reagál	-	3,70%	7,40 %	-	-	5,88 %

4. Táblázat. 0,1 µM transz-zeatinon nevelt WT-Col és pE2FB::amiRBR vonalak gravitropikus érzékenységének statisztikai összehasonlító táblázata.

	pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)			WT-Col		
	Kiindulás	90°-os forgatás	vissza- forgatás	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás
Normális	76,92 %	76,92 %	65,38 %	93,75 %	68,75 %	75 %
Abnormális	23,07 %	3,84 %	15,38 %	6,25 %	6,25 %	-
Nem reagál	-	19,23 %	19,23 %	-	25 %	25 %

5. Táblázat. 10 nM indolecetsavon nevelt WT-Col és pE2FB::amiRBR vonalak gravitropikus érzékenységének statisztikai összehasonlító táblázata.

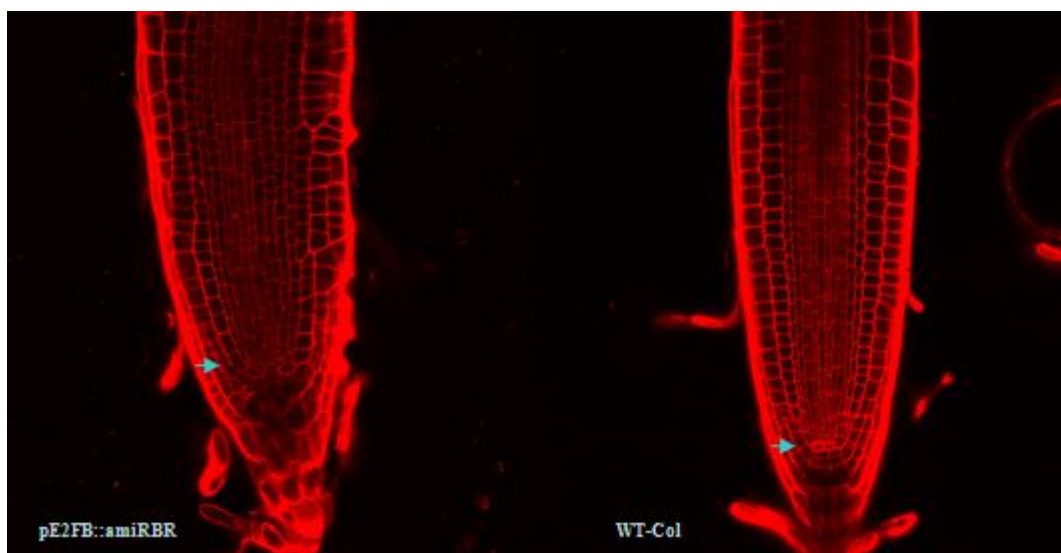
	pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)			WT-Col		
	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás
Normális	34,48 %	89,65 %	65,51 %	100 %	100 %	100 %
Abnormális	65,51 %	6,89 %	24,13 %	-	-	-
Nem reagál	-	3,44 %	10,34 %	-	-	-

6. Táblázat. 50 nM indolecetsavon nevelt WT-Col és pE2FB::amiRBR vonalak gravitropikus érzékenységének statisztikai összehasonlító táblázata.

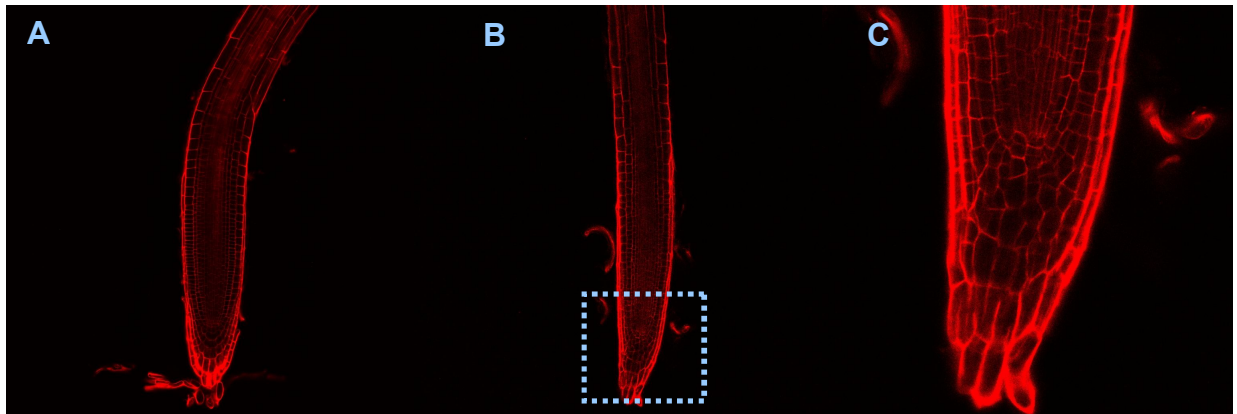
	pE2FB::amiRBR (line 700.23.10/1)			WT-Col		
	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás	Kiindulás	90°-os forgatás	Vissza- forgatás
Normális	53,33 %	66,66 %	73,33 %	100 %	100 %	100 %
Abnormális	46,66 %	26,66 %	20 %	-	-	-
Nem reagál	-	6,66 %	6,66 %	-	-	-

4.5. Az RBR E2FB specifikus csökkenése rendellenes gyökérmerisztémához vezet

Azért, hogy megfigyelhessük, hogy mi történik a transzgenikus növények gyökerében konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk meg őket (15-16. Ábra). Szembetűnő volt, hogy a mutáns gyökerekben a sejtek elrendeződése mennyire eltér a kontroll növények gyökereihez képest.



16. Ábra. Az RBR E2FB specifikus gátlása megváltoztatja a gyökér szerkezetét. Hét napos gyökerek konfokális mikroszkópiás képei láthatóak (kép baloldalon a mutáns, míg a jobban a kontroll). A gyökereket propidium-jodiddal festettük. A nyíl a QC pozícióját jelzi.

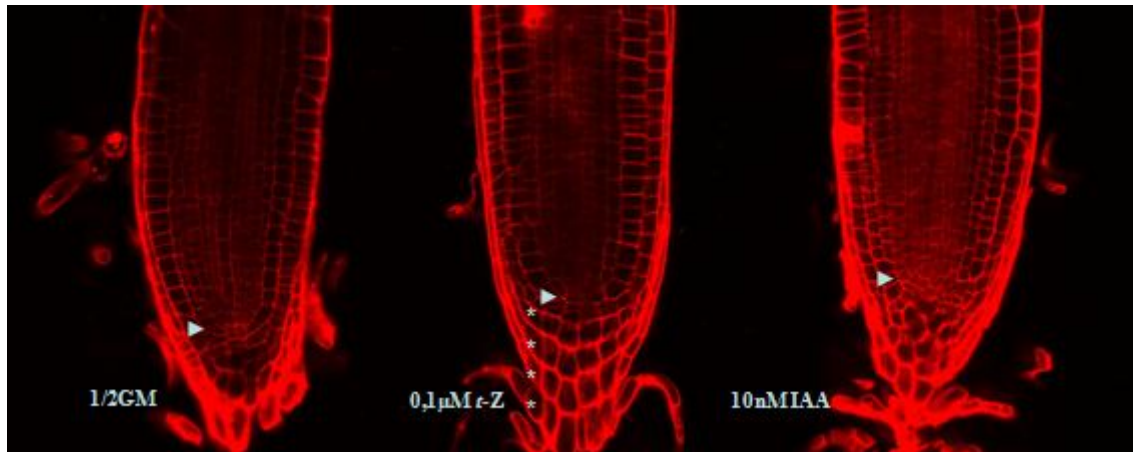


17. Ábra. Az agravitropikus növekedést mutató, de megfelelő hosszúságú 700.23.40-es csíranövények gyökerei nem mutatnak szerkezeti rendellenességet.

Konfokális lézermikroszkópos vizsgálatok nem mutattak elváltozást a vad típussal hasonló hosszúságú, de agravitropikusan növekedő transzgenikus gyökerekben (A). Ezzel szemben a retardált növekedésű transzgenikus gyökerek QC és a columella régióiban extra osztódásokat figyelhettünk meg (B és C). A mikroszkopikus vizsgálat előtt a hat napos gyökereket propidium jodiddal festettük (piros szín).

Különösen a QC és környéke, a gyökérsüvegben található columella sejtrétegeknél lehetett rendellenességeket megfigyelni (15., 16. B, C. Ábra). Ezek a szabálytalanságok arra engednek következtetni, hogy az osztódások iránya és helye rendszertelenné vált.

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a transzgenikus növények gyökerét az auxin és a kinetin. Auxin hatására (10 nM IAA) még kaotikusabb képet mutatott a QC és a gyökérsüveg, míg kinetin hatására a kontroll vad típusú növényekre emlékeztető gyökereket figyelhettünk meg (16. Ábra). Tehát a kinetin, amely a differenciálódást stimulálja képes helyreállítani a mutáns gyökerek columella sejtrétegeit. Mindez arra utal, hogy az RBR hiányos mutáns gyökerekben extraosztódások alakulnak ki, amit a differenciálódásba lépés indukálásával gátolni lehet (kinetin), míg az osztódások további aktiválásával (auxin) fokozni lehet a rendszertelenséget.



18. Ábra. Transzgenikus *Arabidopsis* vonal (700.23/10) gyökércsúcs merisztémái auxin és kinetin jelenlétében. Hét napos csíranövények az ábrán jelzett körülmények között nőttek (kontroll – ½-GM; kinetin – transz-zeatin – tZ; auxin – 10 nM IAA). Propidium-jodid festést követően konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a gyökereket. A nyílhegy a QC pozícióját jelzi, míg a csillagok a szabályos columella rétegeket jelzik, amely csak a kinetin jelenlétében nőtt gyökerekben volt megfigyelhető.

5. Diszkusszió

Az *Arabidopsis* E2FB egy transzkripcióális aktivátor, amely képes stimulálni a sejtosztódási ciklust; az RBR az E2FB funkcióját gátolja, és ennek a represszióknak köszönhetően a sejtek kilépnek az osztódásból. A jelenleg fennálló modell szerint az RBR az E2FB funkcióján keresztül szabályozhatja az osztódásba lépést és a differenciálódás aktiválását (4. Ábra). A növények merisztémájában az E2FB szabad és az RBR kötött formái között feltételezhetően egyensúly alakul ki. Érdekes módon az E2FB fehérje koncentrációja azokban a sejtekben nő meg, ahol a sejtek kilépnek az osztódásból (3. Ábra). Nem tudjuk azonban pontosan mi történik akkor, amikor az E2FB szabad és az E2FB-RBR komplex közti egyensúly elromlik; ismert, hogy differenciálatlan növényi sejt kultúrában az E2FB túltermeltetése a növekedési hormon, az auxin hiányában is képes aktiválni a sejtosztódást (Magyar és mtsai., 2005). Vajon az E2FB szabad, RBR kontrol nélküli formája az RBR csendesítés okozta fenotípusos jelenségeket fogja mutatni?

Munkánk során sikerült „felszabadítani” az E2FB-t az RBR gátlás alól; E2FB specifikusan csökkentettük az RBR mennyiségét transzgenikus *Arabidopsis* növényekben, mégpedig olyan RBR specifikus mikroRNS segítségével, amelyet az E2FB szabályozó régiója (promóter) irányított. A kísérleti hipotézisünk szerint ennek köszönhetően az E2FB RBR szabad formája dominánssá válik, amelyet kísérletesen sikerült is igazolnunk (8. Ábra). Ezek a transzgenikus növények számos olyan fenotípusos elváltozást mutattak, amit korábban az RBR csendesítése során írtak le. Ezek a növények is lényegesen kisebbek voltak, mint a kontroll növények, a pöndörödő levelek megjelenése is extra sejtosztódások jelenlétére utalt hasonlóan ahhoz, amit az RBR RNS interferencia vonalak jellemzése során írtak le (Borghi és mtsai., 2010). Hasonlóan az RBR T-DNS inszerciós mutánsához (Ebel és mtsai., 2004), az E2FB specifikus RBR gátolt növények virágai is jelentős mértékben sterilek voltak (azt azonban csak további vizsgálatok elvégzése után tudjuk majd megmondani, vajon a gamétaképződés hibás működése vagy más, az embrió fejlődés során bekövetkező hiba okozza a gyenge maghozamot). Számos olyan fenotípus jelent meg ugyanakkor, amelyet az RBR csendesítése során nem lehetett megfigyelni. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy az RBR más és más funkciót szabályozhat a különböző E2F

transzkripciók faktorokon keresztül. A legújabb kísérleti eredményeink is ezt támasztják alá; nemrégiben azonosítottunk, olyan transzgenikus vonalakat, ahol az RBR specifikus mikroRNS-et az E2FC promótere által vezérelve fejeztettük ki. Ezekben a transzgenikus növényekben is kimutathatóan csökkent az RBR fehérje mennyisége, de ezek a növények egészen más fenotípusos elváltozásokat mutattak, mint amit a pE2FB::amiRBR növények esetében láttunk (fotomorfogenezisre utaló jelenségek - Magyar nem közölt eredmények).

A növényi szervek kialakulásában fontos szerepet játszik az auxin, a növényi növekedési hormon. A növényi szervek a merisztémából fejlődnek ki, és az auxin maximumnál iniciálódnak. Az pE2FB::amiRBR transzgenikus növények fenotípusai (egyetlen sziklevél, a sziklevelek elhelyezkedése, az új levelek sorrendjének megváltozása, a gyökerek növekedési anomáliái és a gravitropikus gyökérnövekedések jelensége) nagyon hasonlóak, számos, az auxin szignálban mutáns növény fenotípusához (pl. Monopteros – MP, PIN-formed 1 – PIN1, Asymmetric Leaves 1 – AL1; Chandler, 2008; Byrne, 2012). Amikor egy szerv létrejön, akkor közvetlen környezetében az auxin koncentrációja minimális lesz (auxin minimum), mert az összes auxin az új szerv helyére lokalizálódik (auxin maximum - köszönhetően a poláris auxin transzportnak). Ilyen körülmények között nem iniciálódik új szerv közvetlenül az éppen kialakulásban levő mellett, és nem aktiválódik a sejtosztódás sem, amely új sejtekkel látná el a fejlődő növényi szerv primordiumát. A pE2FB::amiRBR növényeknél számtalanszor alakulnak ki új szervek közvetlenül egymás mellett mind az embrionális (sziklevelek fejlődési rendellenességei) mind pedig a poszt-embrionális (levelek) fejlődés során. A kérdés az vajon az auxin elosztása és koncentrációja változott-e meg a pE2FB::amiRBR növényekben vagy a sejtosztódás aktiválódása nem képes az auxin koncentrációt „olvasni”, mégpedig azért nem, mert az E2FB RBR mentes formája olyan helyeken aktiválja az osztódást, ahol az RBR fehérjével gátló komplexet kéne formálnia. Így a szabad E2FB sejtosztódást és szervfejlődést indukál, ahelyett, hogy gátolná azt. Annak eldöntése érdekében, hogy a pE2FB::amiRBR növényekben nem az auxin transzport és a lokális auxin koncentrációkban történő változások okozzák a fenotípust keresztezni kívánjuk a pE2FB::amiRBR vonalat különböző auxin transzport (pl. pPIN1::gPIN1-GFP) és auxinra érzékeny riporter vonalakkal (pDR5::GFP). A csoportunk korábbi munkái alapján már megfigyeltük, hogy az E2FB nemcsak az osztódást aktiválja, de az osztódás irányát is képes befolyásolni (Magyar és mtsai 2005).

Hasonlóképpen, az RBR gyökérspecifikus gátlása is képes a sejtosztódás irányát megváltoztatni. Az RBR E2FB specifikus gátlása a gyökérnövekedésben koordinációs problémákat okoz; mintha a gyökér érzékelné ugyan a gravitációt, de valami mintha akadályozná a kivitelezésben. Ezt erősítette meg a forgatási tesztünk is; a "részeges vagy kacsázó" (különböző íveket és hurkokat leíró) gyökerek is képesek voltak meglepően nagy százalékban a forgatás irányába fordulni, ami arra enged következtetni, hogy nem a gravitáció érzékelésében van a probléma. Ezt a feltételezésünket támogatja, hogy a gravitáció érzékelésében fontos szerepet játszó keményítő szemcsék megjelenésében nem láttunk rendellenességeket. A fordulások, elhajlások hosszú távon a sejtosztódásból eredő változások is lehetnek. A hétnapos növények gyökerében jóval magasabb százalékban fordultak elő rendellenességek, mint amit az egy napos forgatás után láttunk. Ebből arra következtethetünk, hogy az osztódásból eredő hibák az idővel arányosan erősíthetik a fenotípust. Kinetin, amely a gyökérsejtek differenciálódását stimulálja nem mutatott elhajlásokat, hurkokat, szemben az auxinnal, amely alacsony koncentrációban képes fokozni az osztódás mértékét. Ezt erősíti meg, hogy a gyökér auxin maximumánál, a QC és columella QC közeli környékén osztódási zűrzavart lehetett megfigyelni, ami arra utal, hogy nagyobb auxin mennyiségnél az osztódás hiperaktiválódott és iránya dereguláltá vált a transzgenikus növények gyökerében. A kinetin jelenlétében ez a fenotípus is helyre állt; a kinetin differenciálódást stimulál többek között az auxin transzport gátlásán keresztül.

Összefoglalás

1. Az RBR funkciót sikeresen gátoltuk az E2FB specifikus sejtekben. Megállapítottuk, hogy az így szabaddá váló E2FB képes stimulálni az E2FB specifikus target gének kifejeződését, mint amilyen a CDKB1;1.
2. A pE2FB::amiRBR növények számos olyan fenotípust mutattak, amelyeket korábban az RBR csendesítése során lehetett megfigyelni (pl. kisebb növények, pöndörödő levelek).
3. Megjelentek új fenotípusos változások is az RBR E2FB specifikus gátlásakor, amelyek nagyon hasonlítanak az auxin szignál mutánsokban megfigyeltekre (sziklevelek száma és orientációja, phyllotaxis módosulása, gyökerek növekedési problémái).
4. Az a feltételezésünk, hogy az RBR E2FB specifikus gátlása nem az auxin mennyiségét és eloszlását változtatja meg, hanem az osztódások iránya és aktivitása az auxin koncentrációjától függetlené vált. Ennek a hipotézisnek az eldöntésére azonban további kísérleteket kell elvégeznünk.