

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

Ph. D. értekezés

Domoki Mónika

Témavezető: Dr. Fehér Attila

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ,
Növénybiológiai Intézet
Funkcionális Sejtbiológia Csoport

Szegedi Tudományegyetem TTIK
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. BEVEZETÉS	7
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
4.1. Embriófejlődés testi sejtekből	9
4.1.1. Az embriogén potenciál	9
4.1.2. Az embriogén sejt	11
4.1.2.1. Morfológia.....	12
4.1.3. Az embriófejlődés elindítása testi sejtekben	14
4.1.3.1. A szomatikus embriogenezis hormonális szabályozása	14
4.1.3.2. Génkifejeződés	17
4.2. OXR1, egy oxidatív stresszrezisztencia gén	23
4.2.1. OXR1 génkifejeződés	24
4.2.2. OXR1 lokalizáció.....	24
4.2.3. OXR1 stresszválasz	25
5. CÉLKITŰZÉSEK.....	27
6. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
6.1. A kísérleti növények és sejt kultúrák.....	28
6.1.1. Növénykultúrák.....	28
6.1.1.1. Növénykultúrák fenntartása.....	28
6.1.1.2. Növénykultúrák stresszkezelése	28
6.1.2. Sejt kultúrák.....	29
6.1.2.1. Sejt kultúrák fenntartása	29
6.1.2.2. Sejt kultúrák stresszkezelése	29
6.1.3. Lucerna levélprotoplaszt izolálás és tenyésztés	30
6.1.4. Lucerna levélúsztatásos kísérlet.....	30
6.1.5. Lucerna mitokondrium izolálás	31
6.1.6. T-DNS inserciós <i>Arabidopsis</i> mutánsok kiválogatása	31
6.2. Molekuláris biológiai módszerek	32
6.2.1. DNS-vizsgálati módszerek.....	32
6.2.1.1. Baktérium kultúrák	32
6.2.1.2. GATEWAY rendszer	32
6.2.1.3. Plazmid tisztítás.....	33
6.2.1.4. A cDNS könyvtárak létrehozása.....	34
6.2.1.5. A cDNS-ek szekvenálása	36
6.2.1.6. <i>In silico</i> szekvencia analízis:	36
6.2.1.7. cDNS kivonás.....	36
6.2.2. Génexpressziós vizsgálatok	39
6.2.2.1. RNS tisztítás	39

6.2.2.2.	cDNS szintézis	39
6.2.2.3.	Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR)	39
6.2.3.	Fehérje analízis	40
6.2.3.1.	Bakteriális fehérje termeltetés és fehérje tisztítás	40
6.2.3.2.	Ellenanyag előállítás	41
6.2.3.3.	Immunológiai fehérje kimutatás (immunoblot vagy „Western” analízis)	41
6.2.3.4.	Élesztő komplementálás	42
6.2.3.5.	Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata élesztőben	44
6.2.4.	Immunolokalizáció	44
7.	EREDMÉNYEK	46
7.1.	Az „embriogén” típusú sejtosztódás sajátosságai.....	46
7.1.1.	A 2,4-D koncentráció hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek fejlődésére.....	46
7.1.2.	A 10µM 2,4-D hatására nagyobb mértékben kifejeződött géntermékek azonosítása cDNS kivonáson alapuló módszerrel	48
7.1.3.	A génexpresszió 2,4-D indukálhatósága	52
7.1.4.	Génkifejeződés a szomatikus embriogenezis korai és kései szakaszában.....	54
7.2.	Az Oxprot gén illetve fehérje jellemzése	57
7.2.1.	A lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék képesek komplementálni az oxr1_ mutáns élesztő törzs hidrogén-peroxid érzékenységet.....	60
7.2.2.	Génkifejeződési vizsgálatok	62
7.2.2.1.	Szervspecifikus génkifejeződés vizsgálata	62
7.2.2.1.1.	MsOxprot szervspecifikus génkifejeződése	62
7.2.2.1.2.	AtOxprot szervspecifikus génkifejeződése	63
7.2.2.2.	Stresszkörülmények alatti génkifejeződés vizsgálata	64
7.2.2.2.1.	MsOxprot gén stresszkörülmények alatti vizsgálata	64
7.2.2.2.2.	AtOxprot gén stresszkörülmények alatti vizsgálata	66
7.2.2.2.3.	AtOxprot gén potenciális szerepe a hipoxiára adott válaszreakcióban	68
7.2.3.	„OXPROT” fehérje vizsgálatok	72
7.2.3.1.	MsOxprot fehérje lokalizációja	72
7.2.4.	Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata élesztőben	74
7.2.4.1.	AtOXPROT fehérje vizsgálata élesztő kéthibrid rendszerben.....	74
7.2.5.	Növényi vizsgálatok.....	77
8.	MEGVITATÁS.....	79
8.1.	A lucerna (Medicago sp.) szomatikus embriogenezise, mint kísérleti modell.....	79
8.2.	A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben indukált szomatikus embriogenezis során azonosított gének jellemzése.....	81
8.3.	Az Oxprot gén/fehérje funkcionális vizsgálata	86
8.3.1.	Az OXPROT fehérje mitokondriális lokalizációja és potenciális szerepe az oxidatív stresszel szembeni védekezésben.....	86
8.3.2.	Az Oxprot gén abiotikus stressz-indukált kifejeződése	88
8.3.3.	Az Oxprot fehérje potenciális szerepe hipoxia alatt.....	89
8.3.4.	Az Oxprot fehérje potenciális kölcsönható partnerei	90
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	91

10.	SUMMARY	94
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
12.	IRODALOMJEGYZÉK.....	98
13.	FÜGGELÉK.....	106

2. Rövidítések jegyzéke

2,4-D	2,4-diklórfenoxiecetsav
ABS	abszcizinsav
ADH1	alkohol dehidrogenáz 1
AGL-15	Agamous Like 15
AtHB1,	nem szimbiotikus hemoglobin gén (AtGLB1)
AUX1	Auxin Resistant 1
BAP	6-benzil-aminopurin
cDNS	komplementer egyszálú DNS
DDRT-PCR	differenciálisan megjelenített reverz transzkripció PCR
DTT	ditiotreitol
EM sejt	embriogén sejt
ERF4	Ethylene Responsive Element Binding Factor 4
EST	„expressed sequence tag”, egy cDNS klón segítségével meghatározott részszekvencia
GAPDH2	glicerinaldehid-3 foszfát
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GS3	Gibberellin sav
H ₂ O ₂	hidrogénperoxid
IES	indolecetsav
IPTG	izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozid
iSNP	inaktivált SNP
LB	a T-DNS baloldali 25 bp határszekvenciája
LEC1	Leafy Cotyledon 1
LOS2	Low expression of osmotically responsive genes 2
mRNS	hírvivő RNS
MS	Murashige és Skoog táptalaj
MTS	mitokondriális célszekvencia
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NCOA7	nuclear coactivator 7
NE sejt	nem embriogén sejt
NES	naftilecetsav
NO	nitrogén oxid
PCD	programozott sejthalál
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
PQ	paraquat
PVDF	polivinilidén-difluorid
RAP-PCR	véletlenszerű cDNS fragmentumokat sokszorozó PCR
RB	a T-DNS jobboldali 25 bp határszekvenciája
RD2	Responsive to dessication 2
ROS	reaktív oxigén gyök
SA	szalicilsav

SDS-PAGE	nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SERK	szomatikus embriogenezis receptor kináz
SNP	nátrium nitroprusszid
TAIR	The Arabidopsis Information Resource adatbázis
T-DNS	Ti plazmid transzfer-DNS-e

3. Bevezetés

Mint minden élőlény, a növények is számtalan olyan környezeti hatásnak vannak kitéve, melyek szaporodási és növekedési folyamataikat kedvezőtlenül befolyásolják. Helyhezköthető életmódjukból adódóan a változó életkörülményekhez anyagcseréjük és fejlődésük folyamatos változtatásával tudnak alkalmazkodni. Ennek köszönhetően a növények egyedfejlődési programja sokkal rugalmasabb, mint az állatoké, melyre kiváló példa a szomatikus embriogenezisre való képességük. Míg az állati szervezetekben a teljes organizmus egyedfejlődési programjának lefuttatását csak a megtermékenyített petesejt képes elindítani, addig a növényekben a már differenciálódott testi sejtek is képessé tehetők erre, megfelelő körülmények biztosítása esetén. Ezekről a körülményekről általánosságban elmondhatjuk, hogy a növényekben/sejtekben erőteljes stresszválaszt váltanak ki.

Laboratóriumunkban nagy múltra tekint vissza a tenyésztett lucerna levélprotoplasztokban indukált szomatikus embriogenezis kutatása. Egy lucerna genotípus a *Medicago sativa ssp. varia* A2, levélprotoplaszt eredetű sejtjei megfelelő növekedésszabályozókat tartalmazó tenyészoldatban hamar újrasszintetizálják a sejtfalukat és osztódni kezdenek. További fejlődésük szempontjából meghatározó jelentőségű az alkalmazott auxinanalóg, 2,4-diklórfenoxi ecetsav (2,4-D) koncentrációja. Alacsony koncentrációban adva ezt a növekedésszabályozó vegyületet, a sejtek megnyúlnak, nagy központi vakuólumot hoznak létre, és az osztódás során keletkező hasonló méretű és morfológiájú leánysejtek további osztódásaik során organizálatlan *kalluszsövetet* hoznak létre. Ezzel szemben magas dózisú 2,4-D hatására a sejtek kisméretűek maradnak, sűrű citoplazmájúvá válnak több apró vakuóllummal, és *asszimmetrikus sejtosztódás* következik be (a két leánysejt mérete lényegesen eltér), hasonlóan a zigóta első osztódásához. Az így kialakuló polaritás alapot ad az embriogenezis folyamatának megvalósulásához, egészen hasonló fejlődési fázisokat követve, mint ami az ivaros megtermékenyítésből származó embriók esetében figyelhető meg.

Hogy jobb betekintést nyerhessünk azon eseményekbe, melyek az A2 variáns lucerna levélprotoplaszt eredetű embriogén sejttypus kialakulásához vezetnek, egy PCR

alapú cDNS kivonás „cDNA subtraction” módszert alkalmaztunk. A kísérlet célja az volt, hogy a levélprotoplaszt eredetű sejtekben azonosítsuk azokat a géneket, melyek magasabb szinten expresszálódnak a 10 μ M 2,4-D-vel kezelt mintákban az 1 μ M 2,4-D-vel kezeltékhez képest. Az azonosított gének szomatikus embriogenezissel való kapcsolatát egyéb rendszereken végzett további génkifejeződési vizsgálatokkal is megkíséreltük alátámasztani. Így a génkifejeződés 2,4-D koncentráció függését egész lucerna leveleken is vizsgáltuk, ahol a fiatal leveleket 1 és 10 μ M 2,4-D tartalmú folyadék tápközegeben úsztattuk 4 napig. Ezenkívül az azonosított gének relatív génkifejeződését egy független kísérleti rendszerben is megvizsgáltuk. Ebben az esetben a szomatikus embriogenezis rendszerben, naftilecetsav (NES) jelenlétében tenyésztett lucerna (*Medicago sativa ssp. sativa* cv. Rambler) sejteket úgynevezett mikrokalluszokat kezeltünk 100 μ M 2,4-D-vel egy órán át, ami hat hét elteltével szomatikus embriók tömeges megjelenéséhez vezetett. Ezt a tenyésztési rendszert Györgyey János (MTA SZBK) dolgozta ki és az RNS mintákat ő bocsátotta rendelkezésünkre (Györgyey és mtsai. 1991).

Az azonosított gének közül az expressziós mintázat és a feltételezett funkció alapján kiválasztottunk egy, gyakorlati szempontból ígéretesnek ítélt lucerna cDNS-t, melyet az emberi *oxidation resistance 1* (OXR1) génnel való homológiája alapján „Oxprot”-nak neveztünk el. Későbbiekben kiterjesztettük vizsgálatainkat a lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) található homológ génekre is, így megkülönböztetésül a lucerna gént MsOxprot-nak, a lúdfű homológot pedig AtOxprot-nak neveztük el. Feltételeztük, hogy a génnek szerepe lehet a növényeket érő oxidatív stressz kivédésében, így a gén relatív kifejeződését különböző stressz körülmények között vizsgáltuk, hogy közelebb jussunk funkciójának megismeréséhez. Dolgozatomban e gének jellemzése során elért eddigi eredményeinkről is beszámolok.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Embriófejlődés testi sejtekből

Csupán a növényekre jellemző az a képesség, hogy differenciálódott testi, ún. szomatikus sejteikben elindítható az embriógenezis programja. Ez az ún. szomatikus embriógenezis a természetben spontán is előfordul bizonyos fajok, mint pl. *Kalanchoë* sp., *Bryophillum* sp. (Yarbrough 1932) vagy *Malaxis* sp. (Taylor 1967) esetében, ahol a levelek szélén fejlődnek embriók, majd növények. A folyamat azonban sok növényfaj esetében csak mesterségesen váltható ki, *in vitro* körülmények között (áttekintésként pl. Thorpe 1995). *In vitro* szomatikus embriogenezist elsőként sárgarépa esetében figyeltek meg (Reinert 1958, Steward és mtsai. 1958). Az eltelt évtizedek során számos más növényfaj esetében sikerült a szomatikus embriógenezis elindítására alkalmas körülményeket kidolgozni. A kísérleti tapasztalatok alapján nyilvánvaló, hogy sem a szomatikus embriógenezisre való képesség, sem az embriógenezis programjának elindítását kiváltó körülmények nem általános érvényűek a növények között. Míg bizonyos fajok esetében a szomatikus embriófejlődés könnyen és hatékonyan előidézhető, más fajoknál évtizedes kutatások sem vezettek eredményre. Míg egy adott kezelés az egyik faj esetében rendkívül hatékony az embriogén fejlődési válasz kiváltásában, teljesen hatástalan egy másik faj egyedeinél, amelyek viszont rendkívül jól reagálnak egy eltérő kezelésre. Általános következtetések levonása tehát nagyon nehéz. Az alábbiakban megkísérlem áttekinteni a szomatikus sejtek embriogén sejté válásának legfontosabb kérdéseit.

4.1.1. Az embriogén potenciál

Az embriogén képesség vagy potenciál alatt egy adott növényi genotípus (faj, fajta, egyed), illetve explantum azon tulajdonságainak összességét értjük, amely megfelelő belső vagy külső körülmények teljesülése esetén megengedi, hogy differenciált

sejtekből embriogén sejtek fejlődhessenek (Fehér és mtsai. 2005). A szomatikus embriogenezisre való képesség kétségtelenül genetikailag meghatározott. Egy adott fajon belül is léteznek embriogén és nem-embriogén genotípusok. A genetikai öröklődést bizonyítják azok a keresztezési kísérletek is, melyek során a képességet, illetve az azért felelős géneket, sikerült átvinni embriogén fajtákból nem-embriogén fajtákba (Bowley és mtsai. 1993, Kielly és Bowley 1992, Moltrasio és mtsai. 2004). Az utóbbi években számos olyan faj/genotípus esetében dolgoztak ki hatékony szomatikus embriogenezis kiváltására alkalmas kísérleti rendszert, amelyek korábban ebből a szempontból teljesen reménytelennek tűntek (Krishna Raj és Vasil 2006). A siker gyakran a megfelelő kiindulási állapot (fejlődési állapot, explantum típus) és az alkalmazott kezelések, tenyésztési körülmények függvénye. Ezért úgy tűnik, hogy a genetikai háttér elsősorban azt határozza meg, hogy az embriogén képesség hol, mikor és milyen körülmények között nyilvánulhat meg.

Szomatikus embriók elméletileg bármely növényi szerv, illetve szövet sejtjeiből fejlődhetnek. Ez a gyakorlatban is így van, például néhány magas embriogén képességgel rendelkező sárgarépa vagy lucerna genotípus esetében. A növényfajok/genotípusok többségében azonban a képesség bizonyos fejlődési állapotokra és bizonyos szövetekre korlátozódik. A kísérleti tapasztalatok arra mutatnak, hogy van egyfajta „embriogén képesség grádiens” a növényi szervek között (Mashayekhi és Neumann 2006). Az embriogén válasz a legerőteljesebb az embrió eredetű szövetekben és egyre csökken a hipokotil, levélnyél, levél, gyökér esetében. Az embriogén potenciál a növények egyedfejlődése során is fokozatosan csökken. A csökkenés mértéke fajtól függ, de ebből a szempontból jelentős különbség van például az egy-, illetve kétszikűek között. Az egyszikű növényekben az embriogén képesség szinte teljes mértékben az embrió, illetve merisztéma eredetű szövetekre korlátozódik pl.: éretlen embrióra, a magra, illetve a levélalapra (Gramineae); levélcúcsra (Orchideaceae), hagymára (Liliaceae) (Krishna Raj és Vasil 2006).

Az egy-, illetve kétszikűek közötti fenti különbség az eltérő egyedfejlődési programjuknak tulajdonítható. Az egyszikű növények sejtjei az egyedfejlődés során korán és gyorsan differenciálódnak és elvesztik mitotikus és embriogén képességüket egyaránt, melyek természetesen szoros kapcsolatban állnak egymással: sejtosztódás

nélkül nincs lehetőség az embriogenezis programjának elindítására. Kimutatták azt is, hogy a fiatal-felnőtt („juvenilis-adult”) átmenet szabályozása is eltér az egy- és kétszikű növények között (Chuck és Hake 2005).

Az embriogén képesség sok esetben fenntartható vagy visszanyerhető, amennyiben a megfelelő explantumból, adott körülmények között (pl. magas 2,4-D koncentráció) *in vitro* sejtenyészetet (embriogén sejt kultúrát) hozunk létre. Ezekben az esetekben a differenciált testi sejtől először dedifferenciált kallusz sejt fejlődik, amely megfelelő körülmények hatására az embriófejlődés útjára léphet. Ez a szomatikus embriogenezis közvetett útja, szemben a differenciált sejtől közvetlenül elinduló embriófejlődéssel.

4.1.2. Az embriogén sejt

Az embriogén kompetencia a sejteknek az a tulajdonsága, melynek köszönhetően megfelelő szignálok hatására képesek embrióvá fejlődni (Halperin W 1995). Ezek a sejtek egyfajta átmenetet képeznek a differenciált testi sejt és az embriogén sejt között (Toonen és mtsai. 1994).

Egy adott explantum nem minden testi sejtje lép az embriófejlődés útjára még a legoptimálisabb feltételek esetében sem, az azonos genetikai háttér és külső körülmények ellenére sem. Az embriogén kompetencia csak a sejtek egy kisebb vagy nagyobb hányadában alakul ki, és így az egyedi sejt szintjén értelmezhető. Általánosságban véve elmondható, hogy a differenciált sejtek speciális funkcióinak elvesztése (dedifferenciáció) az embriogén kompetencia kialakulásának alapfeltétele. Ez teszi a sejteket képessé arra, hogy az új egyedfejlődési szignálra fejlődési programjuk megváltoztatásával reagáljanak.

Az embriogén sejt fogalmán már azt a sejtípust értjük, mely további külső szignál (pl. növekedésszabályozó) hiányában is képes az embriófejlődési program lefuttatására (de Jong és mtsai. 1993). Azt, hogy a kompetens sejt mikor válik embriogén sejté, az esetek többségében nagyon nehéz eldönteni.

Az embriogén sejtek vizsgálata során a különböző kísérleti rendszerekben feltártak olyan jellegzetességeket, melyek többé-kevésbé általánosnak mondhatóak. A

tulajdonságok némelyike már az embriogén kompetencia kialakulásakor megjelenik, a kompetens sejtek ármeneti jellegéből következően.

4.1.2.1. Morfológia

A sárgarépa (*Daucus carota* L.) szomatikus embriogenezisének vizsgálatára legelterjedtebb módszer során hipokotil darabokból sejtsuszpenziót indítanak 2,4-D jelenlétében. Néhány hét elteltével a tenyésztett sejtekből ún. pro-embriogén sejt kolóniák („proembriogen cell mass”, PEM), majd 2,4-D megvonását követően ezekből szomatikus embriók fejlődnek (de Vries és mtsai. 1988). A sejtsuszpenziós kultúrában kezdetben egyedi sejtek is nagyszámban előfordulnak. Ezek eltérő morfológiájúak voltak, és ennek alapján öt csoportba sorolhatóak. Minden csoportban voltak embriogén kompetenciával rendelkező sejtek, amit az egyedi sejtek sorsát mikroszkópos video felvételeken nyomonkövetve állapítottak meg (Toonen és mtsai. 1994). A legtöbb embrió abból a sejtfrakcióból keletkezett, melyben kicsi, kerek, sűrű citoplazmájú sejtek voltak. Egy másik megközelítést alkalmazott Nomura és Komamine (1985), akik sűrűség gradiens centrifugálással frakcionálták a sárgarépa sejt kultúra sejtjeit. Ők is azonosítottak egy kisméretű, izodiametrikus, sűrű citoplazmájú sejtekből álló csoportot, melynek tagjai 90% hatékonysággal voltak képesek embrióvá fejlődni. Ezt a frakciót „State 0” embriogén kompetens sejteknek nevezték el, ami 2,4-D jelenlétében „State 1” embriogén sejté alakult (Nomura és Komamine 1995). Szintén sárgarépa esetében figyelték meg azt, hogy az embriogén kompetens sejtekre jellemző *serk* gén (lásd részletes leírását később) kifejeződése 2,4-D kezelt hipokotilból származó sejtsuszpenzióban csak egy korlátozott számú, ovális vagy háromszög alakú sejtben volt megfigyelhető (Schmidt és mtsai. 1997). Ugyanakkor a sárgarépa *serk* gén megfelelőjének a kifejeződése gyűszűvirűg (*Dactylis glomerata* L.) levél explantum sejtekben csak a fentebb már leírt, kisméretű, kerek, sűrű citoplazmás sejtekben volt megfigyelhető, bár sejt kultúrában egyes megnyúlt, vakuolizált sejtek is kifejezték a markert (Somleva és mtsai. 2000).

A sárgarépa sejtek sorsát egy sejt felszíni marker, a JIM8 sejt fal epitóp (lásd alább), segítségével nyomonkövetve Pennel és munkatársai (1992) megállapították, hogy az

epitópot hordozó sejtek egy átmeneti (kompetens) sejtállapotot képviselnek. Ezek a sejtek embriogén kompetenciával még nem rendelkező sejtekből fejlődnek, sorsukat tekintve pedig vagy megnyúlnak és elpusztulnak, vagy osztódnak és létrehozzák az epitópot már nem expresszáló embrió iniciális sejtet.

Lucerna esetében sejt kultúrák frakcionálása nem vezetett olyan egyedi sejtek azonosításához, melyek embriogén kompetenciával rendelkeznek (Xu és Bewley 1992), de a 224-500 μm méret frakcióba tartozó sejt kolóniák kicsiny, izodiametrikus, sűrű citoplazmás sejtekből álltak és képesek voltak embrióvá fejlődni. Hasonló megfigyelést tettek *Picea abies* esetében (Filonova és mtsai. 2000). Az A2-es lucerna variáns levélprotoplasztok megfelelően magas ($>10 \mu\text{M}$) 2,4-D koncentráció mellett szintén embrióvá fejlődnek (Bögre és mtsai. 1990, Dudits és mtsai. 1991, Ötvös és mtsai. 2005, Pasternak és mtsai. 2002), megfelelően alacsony 2,4-D koncentráció ($<1 \mu\text{M}$) mellett viszont differenciálatlan sejt kolóniákat hoznak létre. Az első esetben a protoplasztokból fejlődő sejtek kisméretűek, izodiametrikusak és sűrű a citoplazmájuk, a második esetben megnyúlnak és vakuolizáltak.

Cikória (*Cichorium* hybrid '474') levél sejtekből közvetlenül, kallusz fázis közbeiktatódása nélkül fejlődnek szomatikus embriók (Dubois és mtsai. 1991). Az embriogén kompetens sejteket ebben az esetben is sűrű citoplazma jellemzi. Jellemző még ezekre a sejtekre a vakuolum fragmentálódása és a központi helyzetű sejtmag (Blervacq és mtsai. 1995). A sejtmag centrális helyzetét embriogén kompetens kukorica sejtek esetében is megfigyelték, azt is megállapítva, hogy a sejtmagot radiális mikrotubulus, illetve aktin szálak rögzítik (Samaj és mtsai. 2003).

4.1.3. Az embriófejlődés elindítása testi sejtekben

Bár szomatikus embriogenezis egyes növényfajokban spontán is előfordul, a legtöbb növényfaj esetében csak megfelelő *in vitro* körülmények biztosítása esetén, mesterségesen idézhető elő. Ez magában foglalja a növény egy részének (explantum) eltávolítását a növényről és mesterséges tápközegbe helyezését. Ez a körülmény kétséget kizáróan jelentősen hozzájárul, bár nem elégséges ahhoz, hogy a sejtekben egy új egyedfejlődési program indulhasson el. A differenciált növényi szövetet kiszakítva a teljes szervezetből, amellett, hogy megszűnik a tápanyag ellátottság, elmaradnak a többi szervből, szövetből származó egyedfejlődési szignálok is. Mivel a növényekben a sejtek differenciációját elsősorban a növényi szervezetben elfoglalt helyzetük, a többi sejttel való kapcsolatuk („pozicionális információ”) határozza meg (van den Berg és mtsai. 1995, 1997), a sejteket eltávolítva a növényből, azok mintegy felszabadulnak a „differenciációs kényszer” alól („dedifferenciálódnak”), és képessé válnak új szignálokra reagálva új egyedfejlődési programot elindítani. A növényeknek ez a sajátossága a növények *in vitro* vegetatív szaporításának és a növényi sejt-, és szövettenyésztési technikáknak az alapja.

A növényi sejtek *in vitro* életben tartásához az esetek többségében a tápanyagok mellett növekedésszabályozó anyagok (hormonok) is szükségesek, elsősorban auxin és citokinin. Az auxin és citokinin egyebek mellett a növényi sejtek osztódásának is legfőbb szabályozói, a dedifferenciált sejtek hosszú távú életben tartása pedig összefügg osztódási képességük fenntartásával.

4.1.3.1. A szomatikus embriogenezis hormonális szabályozása

A növények egyedfejlődése során a különböző fejlődési fázisok közötti átmenetek szabályozásáért a növényi hormonok felelősek, s ezek közül a legáltalánosabb az auxinok szerepe. Így van ez a szomatikus embriogenezis esetében is, amely az esetek túlnyomó többségében külső auxin hatására indul el a sejtekben (áttekintésként Dudits és mtsai.

1991, Yeung 1995). Azonban elindulhat *in vitro* embriófejlődés a testi sejtekben spontán, külső hormonkezelés nélkül (Choi és mtsai. 1998), vagy egyéb hormonok, pl. citokinin (Sagare és mtsai. 2000), abszcizinsav (Nishiwaki és mtsai. 2000) hatására is. A hormonok helyett használhatók más indukáló ágensek is, mint például magas cukorkoncentráció vagy ozmotikus stressz (Kamada és mtsai. 1993), nehézfémstressz (Kiyosue és mtsai. 1990), magas hőmérséklet (Kamada és mtsai. 1989).

Az indukáló ágensek széles köre azt jelzi, hogy a szomatikus embriogenezis nem tekinthető egy specifikus külső szignálra adott specifikus válasznak. Feltételezhető, hogy a fenti kezelések a sejtekben azonos belső folyamatokat indítanak el, melyek végső soron azonos válaszhoz, embriófejlődéshez vezetnek. Ezek a belső folyamatok kapcsolatban lehetnek például a sejtek hormonális szabályozásával.

A belső hormonszinteket vizsgálva több faj és explantum esetében megfigyelték, hogy a magasabb endogén auxin (indolecetsav, IES) szint magasabb szintű embriogén válasszal jár együtt (Ivanova és mtsai. 1994, Jimenez és Bangerth 2001a, 2001b, 2001c, Michalczuk és Druart 1999, Rajasekaran és mtsai. 1987, áttekintésként Jimenez 2005, Jimenez és Thomas 2006). Más esetekben azonban nem állapítottak meg hasonló korrelációt, és az eredmények ellentmondásossága nem teszi lehetővé az általánosítást.

Sárgarépa sejtekben, az embriogenezis indukálására alkalmazott 2,4-D kezelés nagymennyiségű endogén indolecetsav (IES) felhalmozódását eredményezte (Michalczuk L és mtsai. 1992a, 1992b). A szerzők feltételezték, hogy a megnövekedett endogén auxintartalomnak fontos szerepe van az embriogén fejlődés elindításában. A belső IES szint átmeneti emelkedését figyelték meg éretlen embrióból származó napraforgó explantumokban szomatikus embriogenezist indukáló körülmények között (Charrière és mtsai. 1999). Az auxinkoncentráció maximuma egybeesett azzal az időponttal, amit követően az embriófejlődés programja visszavonhatatlanná vált. Ebben a kísérleti rendszerben a belső auxin szintet immuno-citokémiai módszerekkel is nyomonkövették az indukciót megelőzően, az alatt, és azt követően, ami megerősítette, hogy a belső auxin szint megemelkedése lehet az a szignál, ami elvezet az embriogén program aktiválásához (Thomas és mtsai. 2002). Az endogén auxinszintnek az embriófejlődés elindításában betöltött fontos szerepét alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a sárgarépa

zigótában a megtermékenyítést követően szintén lezajlik egy jelentős átmeneti auxinszint emelkedés (Ribnicky és mtsai. 2001).

Számos kísérleti adat utal az auxin mellett egy másik növényi hormonnak, az abszcizinsavnak (ABS), a szomatikus embriogenezis elindításában betöltött szerepére (áttekintésként Jimenez 2005). Sárgarépa csíranövények testi sejtjeiben ABS alkalmazásával kiváltható az embriogén válasz (Nishiwaki és mtsai. 2000). Éretlen embrió eredetű napraforgó (*Helianthus annuum* L.) explantumokban ABS alkalmazása megemelte a belső IES szintet és embriófejlődést eredményezett olyan körülmények között is, amikor egyébként ez nem következik be (Charrière és mtsai. 1999). Ivanova és munkatársai (Ivanova és mtsai. 1994) fordított összefüggést figyeltek meg lucerna (*Medicago sativa* L. *spp. falcata*) fajták embriogén potenciálja és endogén ABS tartalma között. Ezek a megfigyelések arra is felhívják a figyelmet, hogy a külső és belső hormonkoncentráció változások által kiváltott reakciók eltérőek, akár ellentétesek is lehetnek (pl. eleve magas belső ABS szint gyengébb választ eredményezhet külső hormonális vagy stressz hatásokra).

A belső ABS szintnek a szomatikus embriogenezis korai szakaszában betöltött közvetlen szerepét jelzik azok a kísérletek, melyek során dohány (*Nicotiana plumbaginifolia*) protoplaszt eredetű sejtekben a belső ABS szintet manipulálták (Senger és mtsai. 2001). Az endogén ABS szint csökkentését többféle módon érték el: ABS ellenanyag egyláncú variábilis fragmentjét (anti-ABS scFv) fejeztették ki transzgenikus dohány növényekben, ABS szintézis gátlót, fluoridont használtak, illetve az *aba1* és *aba2* ABS szintézis mutánsokat használták a vizsgálatokhoz. A protoplaszt eredetű *Nicotiana plumbaginifolia* sejtekből megfelelő körülmények között szomatikus embriók fejlődése indul el. Azonban az összes olyan fent leírt esetben, ami csökkent belső ABS szintet eredményezett, a morfogenezis megakadt a pre-globuláris embrió stádiumot megelőzően. Külső ABS alkalmazásával a gátlás visszaállítható volt (Senger és mtsai. 2001).

Egy harmadik növényi hormon, amelyet összefüggésbe hoznak a szomatikus embriogenezissel, a gibberellinsav (GS3), bár ebben az esetben a megfigyelések ellentmondásosak (Jimenez 2005, Jimenez és Thomas 2006). GS3 kezelés gátolta pl. sárgarépa szomatikus embriogenezisét (Fujimura és Komamine 1975, Tokuji és Kuriyama 2003), de serkentette azt pl. csicseriborsó (Hita és mtsai. 1997) és lucerna

(Rudus és mtsai. 2002) esetében. Ugyanakkor a gibberellin 3-oxidáz enzim transzkriptumának felhalmozódása számos esetben együttjár a szomatikus embriogenezis indukciójával (Chugh és Khurana 2002, Rensing és mtsai. 2005). Megfigyelték azt is, hogy a gibberellin szintézis gátlása aberrációkat eredményez a szomatikus embriók fejlődésében (Mitsuhashi és mtsai. 2003).

4.1.3.2. Génkifejeződés

A legnyilvánvalóbb megközelítés a szomatikus embriogenezis során aktiválódó gének azonosítására szomatikus embriók és kallusz sejtek, illetve csíranövények génkifejeződési mintázatának összehasonlítása. Ez a megközelítés elvezetett számos, a szomatikus embriók különböző fejlődési fázisaiban specifikusan kifejeződő gén azonosításához, de nem nyújtott információt az embriogén képesség kialakulásával kapcsolatos folyamatokról (Dong és Dunstan 1996, Dong és Dunstan 1999, Lin és mtsai. 1996, Zimmerman 1993).

Éppen ezért, számos próbálkozás történt különböző kísérleti rendszerekben az embriogenezist kiváltó tényező által okozott génkifejeződési változások feltérképezésére. A sárgarépa szomatikus embriogenezisének kísérleti rendszere esetében az indukció idejének meghatározása nagyon nehéz, mert a sejtek hetekig 2,4-D jelenlétében fejlődve, ún. proembriogén sejtkolóniákat hoznak létre. Ezek továbbfejlődését a 2,4-D gátolja és az embriófejlődés a 2,4-D eltávolítását követően, hormonmentes tápoldatban zajlik (de Vries és mtsai. 1988). Sato és munkatársai (1995) a cDNS kivonás (szubsztrakció) módszerét alkalmazták és differenciálatlan kallusz sejtek mRNS populációját hasonlították össze a 3-napja már hormonmentes tápközegben fejlődő proembriogén sejtkolóniák mRNS készletével. A 9 azonosított gén közül azonban a visszaellenőrzéseket követően csak egy volt valóban specifikus az embriogén kolóniákra. Ez a CEM6 jelű cDNS egy glicingazdag fehérjét kódol, amelynek a sejtfalszintézisben lehet szerepe. A legkorábbi génexpressziós változások feltárását tűzték ki célul Yasuda és munkatársai (2001), akik a differenciálisan megjelenített reverz transzkripciós PCR („differential display RT-PCR”; DDRT-PCR) technikát használták embriogén és nem-embriogén sárgarépa sejtkultúrák

mRNS készletének összehasonlítására. Három cDNS-t azonosítottak. Az egyik által reprezentált mRNS (#43) a szomatikus embriogenezis indukcióját követően nagyon hamar megjelent, majd a globuláris embriókban eltűnt. Jelen volt még a hipokotilban is. Ez a cDNS egy thaumatin-szerű fehérjét kódol, amelynek feltehetően a stresszválaszhoz van köze. A második cDNS (#93) mRNS-e a szomatikus embriogenezis indukciós fázisán kívül jelen volt a későbbi fázisokban és a sejtszuszpenziós kultúrában is. Ez a cDNS egy prolingazdag fehérjét kódol. Hasonló kifejeződési mintázatot mutatott a #87 cDNS által reprezentált gén is, de az általa kódolt fehérje funkciója nem ismert.

Schmidt és munkatársai egy ún. „hideg plakk” analízisből azonosítottak egy receptor kináz fehérjét, amelyet SZOMATIKUS EMBRIOGENEZIS RECEPTOR KINÁZnak (SERK) neveztek el (Schmidt és mtsai. 1997). A *serk* gén és terméke a feltételezett receptor, illetve szabályozó funkciója miatt további intenzív vizsgálatok tárgyává vált. A sárgarépa szomatikus embriogenezise során a *serk* gén kifejeződését detektálni tudták az embriogén sejt kultúrákban és a globuláris stádiumú szomatikus embriókban, de ezt követően az expresszió megszűnik (Schmidt és mtsai. 1997). Az embriogenezis szabályozásában betöltött általános szerepére utal, hogy a zigotikus embriókban is kifejeződik a korai globuláris stádiumig bezárólag, de nem detektálható semmilyen más szövetben. A *serk* gén promóterét a luciferáz riporter génhez fuzionálva bejuttatták sárgarépa sejtekbe és a sejtek sorsát video felvételekkel követték („video cell tracking”; Schmidt és mtsai. 1997). Ezzel a módszerrel igazolták, hogy a *serk* gént (és a *serk:luciferáz* génfüziót) expresszáló sejtek valóban azok a sejtek, amelyek szomatikus embriókká fejlődnek. A *serk* gén megfelelőjét azonosították és izolálták lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L.) cDNS könyvtárból is (*Atserk1*; Hecht és mtsai. 2001). A lúdfű *serk1* génjének kifejeződése már a megasporogenezis alatt megjelent és az embriózsák összes sejtjében detektálható volt a megtermékenyítésig, majd az embrióban a szív stádiumig (Hecht és mtsai. 2001). Ezt követően a kifejeződés nem volt kimutatható a magban. A kifejlett növényben alacsony expressziót figyeltek meg a vaszkuláris edénynyalábokban. Amennyiben a lúdfű csíranövényeket auxint tartalmazó táptalajon nevelték, hogy embriogén kalluszkultúrát hozzanak létre, a *serk* gén expressziója megjelent a hajtáscsúcsban és a hipokotilban. A *serk* gén kifejeződése tehát nem korlátozódik az embriogén sejtekre és embriókra, hanem olyan szövetekben is

megnyilvánul, amelyek alkalmasak embriogén sejt kultúrák létrehozására (Hecht és mtsai. 2001). Az *Atserk1* gén kifejeződése magas az *ampl* (*altered morphogenesis1*) mutánsból létrehozott sejt kultúra sejtjeiben (Hecht és mtsai. 2001, Mordhorst és mtsai. 1998). Ez a sejt kultúra megemelkedett embriogén képességgel rendelkezik. Ezek alapján feltételezték, hogy az AMP1 fehérje az embriogén fejlődés gátlója (represszora) és ezt a hatást a *serk* gén kifejeződésének gátlásán keresztül fejti ki a csírázást követően (Hecht és mtsai. 2001).

A *serk* gén megfelelőinek kifejeződését vizsgálták más növényfajokban is. A gyűszűvirág (*Dactylis glomerata* L.) esetében, ahol szomatikus embriók fejlődhetnek közvetlenül a levélsejtekből, de embriogén kallusz sejtekből is, a *serk* gén kifejeződését kis, gömbalakú, sűrű citoplazmájú sejtekben detektálták, amelyek sorsát nyomon követve szintén igazolni tudták, hogy ezek a sejtek embrióvá fejlődnek (Somleva és mtsai. 2000). Azonban ebben a növényfajban a *serk* expresszió megmarad az embrió globuláris stádiumát követően is a merisztematikus régiókban.

Fentiek alapján elmondható, hogy a *serk* gének csoportja olyan eltérő kináz fehérjéket kódol, melyek az embriogenezis szabályozásában kisebb-nagyobb specifitással vesznek részt.

A sárgarépa mellett más növények esetében is megkísérelték az embriogén sejtek kialakulásával kapcsolatos gének azonosítását. Ezek a kísérleti rendszerek abból a szempontból ígéretesebbnek tűntek, hogy az embriogén fejlődés elindulása időben sokkal behatároltabb. Egy magas embriogén potenciállal rendelkező cikória genotípus (*Cichorium* hybrid '474') levélsejtjeiből közvetlenül fejlődnek embriók hormonkezelés hatására (Blervacq és mtsai. 1995, Dubois és mtsai. 1991). A kezeletlen és a kezelt levélszövet mRNS készletének összehasonlítása számos differenciálisan expresszáldó gén azonosításához vezetett. Ezek között több a kórokozókkal szembeni védekezésben szerepet játszó gén (pl. β -1,3-glukanáz gén) (Helleboid és mtsai. 1998) és egy nem-szimbiotikus hemoglobin gén (Hendriks és mtsai. 1998) is szerepelt. Ezeknek a géneknek a kifejeződése a kezeléseik által a sejtekben kiváltott stresszreakciókkal lehet kapcsolatban.

A lucerna (*Medicago sativa* L.) többek között azért alkalmas a szomatikus embriogenezis kutatására, mert számos magas embriogén potenciállal rendelkező és nem-

rendelkező genotípusa ismert. Ezek embriogén/nem-embriogén sejt kultúráinak összehasonlítása hasznos információkkal szolgálhat az embriogén képesség kialakulása szempontjából is. Giroux és Pauls (1997) egy cDNS könyvtár hagyományos differenciál szűrését végezték el. Ehhez, méret szerinti elválasztás alapján feldúsított embriogén sejtfrakciót használtak. Három ígéretes cDNS klónt azonosítottak (*aset1-3*), amelyek specifikusan az embriogén sejtekre voltak jellemzőek. A gének funkcióit nem vizsgálták, az egyik egy hidrofób fehérjét, a másik egy integrális membrán fehérjét, a harmadik egy ismeretlen fehérjét kódolt.

A *Medicago sativa* L. *ssp. falcata* levelekben közvetlenül indukálható embriófejlődés sebzés és 2,4-D együttes alkalmazásával (Denchev és mtsai. 1991). Kezeletlen és kezelt levelekből a kezelést követő különböző időpontokban mRNS-t izoláltak, majd a cDNS-sé konvertálás után véletlenszerű cDNS fragmentumokat sokszoroztak meg PCR amplifikációval („arbitrary primed” PCR vagy RAP-PCR) (Fowler és mtsai. 1998). Az indukciót követően expressziós változást mutató cDNS fragmentumokat azonosítottak. A fragmentumok többsége ismeretlen fehérje szekvenciát kódolt. Két esetben tudták a differenciális kifejeződést megerősíteni. Az egyik gén egy calnexin-szerű fehérjét kódolt, feltételezhető chaperon funkcióval (Huang és mtsai. 1993), a másik egy multidrog rezisztencia fehérje volt, amely specifikusan a globuláris embriók megjelenésekor fejeződött ki.

Az utóbbi évek alatt több, az embriogenezis folyamata alatt aktiválódó transzkripciós faktort azonosítottak. Néhány esetben azt tapasztalták, hogy ha ezeket a transzkripciós faktorokat ektopikusan kifejeztetik vegetatív sejtekben, azokban kisebb-nagyobb gyakorisággal embriófejlődés indul el. Ilyen transzkripciós faktorok a CCAAT szekvenciát felismerő LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) (Lotan és mtsai. 1998), a B3-domént tartalmazó LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2) (Stone és mtsai. 2001), a homodomén transzkripciós faktor WUSCHEL (WUS) (Zuo és mtsai. 2002) és a repce androgenezisben betöltött szerepe alapján azonosított AP2/ERF családba tartozó MADS-motívumot tartalmazó transzkripciós faktor BABY BOOM (BBM) (Boutilier és mtsai. 2000). Érdekes módon, a fenti transzkripciós faktorok nem termelődnek a zigotikus embriogenezis legkorábbi szakaszában (áttekintésként Koltunow és Grossniklaus 2003). Ez a megfigyelés és az a tény, hogy ennyiféle transzkripciós faktor képes önmagában

elindítani az embriófejlődés programját testi sejtekben arra utalhat, hogy nem egyes specifikus gének aktiválása a döntő a folyamat elindításában, hanem az embriogenezis programjának lefuttatásához szükséges celluláris környezet kialakítása, és ezzel összefüggésben egy génaktivációs kaszkád elindítása.

A *lec1* gén kifejeződését igazolták sárgarépa, lúdfű és lucerna szomatikus embriókban (Gaj és mtsai. 2005, Yazawa és mtsai. 2004). Lúdfű *lec1*, *lec2* és *fus3* mutánsokban a szomatikus embriogenezis 65-94%-os hatékonysága (embriogén választ adó explantumok aránya) 0-3,9%-ra csökkent, ami közvetlen bizonyítéka annak, hogy ezek a gének a zigotikus embriogenezis mellett a szomatikus embriogenezis során is fontos szerepet töltenek be (Gaj és mtsai. 2005).

Mindezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a növények vegetatív (szomatikus) sejtjeiben az embriogén program kromatin-mediált transzkripcionális represszió alatt áll, a szomatikus embriogenezis indukciója során tehát ennek a gátlásnak a felszabadítása kell, hogy megtörténjen.

Medicago sativa L. sejt kultúra rövid, egy órás, kezelése magas, 100 μ M 2,4-D-vel, elegendő ahhoz, hogy a szomatikus embriogenezis programja elinduljon és a sejtek egy része hormonmentes körülmények között is embrióvá fejlődjön (Dudits és mtsai. 1991). A kezelt sejtekből készült cDNS bank differenciális szűrése kezelt és kezeletlen sejtekből származó cDNS-sel több differenciálisan expresszálandó gén azonosítását eredményezte, köztük hősokk fehérjék génjeivel (Györgyey és mtsai. 1991), egy kis molekulatömegű prolinban gazdag fehérje génjével (Györgyey és mtsai. 1997) és egy ismeretlen kalcium-kötő fehérjével (Dudits és mtsai. 1991).

Számos kísérlet igazolja, hogy a hősokk gének expressziója szorosan kapcsolódik a szomatikus embriogenezis folyamatához (áttekintésként Dudits és mtsai. 1995, Schoffl és mtsai. 1998). A hősokk gének, nevükkel ellentétben nem csak a hőstresszt követően fejeződnek ki, hanem többségük kifejeződése egyedfejlődési szabályozás alatt is áll (Schoffl és mtsai. 1998). Ezeknek a fehérjéknek a többsége chaperon funkciót tölt be, elősegítve az újonnan szintetizált fehérjék megfelelő konformációjának és kölcsönhatásainak kialakulását. Nyilvánvaló, hogy ez a funkció alapvető minden olyan jelentősebb fejlődési átmenet során, amely a fehérjekészlet átrendeződésével is jár, beleértve a testi sejtek embriogén sejtekké válását.

A közelmúltban modern genomikai módszerek is alkalmazásra kerültek az embriogén képességhez köthető, illetve a szomatikus embriogenezis indukcióját követő, génexpressziós változások feltárására. Imin és munkatársai (Imin és mtsai. 2005) embriogén és nem-embriogén *Medicago truncatula* Gaertn. genotípusok levél explantumait tenyésztették olyan körülmények között, melyek az embriogén genotípus esetében szomatikus embriók fejlődését indukálták. Különböző időpontokban (2 5 és 8 hét) vett minták fehérjekészletének (kb. 2000 fehérje mintánként) összehasonlítása alapján 54 fehérje szintje változott jelentősen a vizsgált időtartam alatt. Ezeknek mintegy 60%-a eltérő változásokat mutatott az embriogén és nem-embriogén sejtekben. Összesen 16 fehérje szekvenciáját sikerült azonosítani. Az embriogenezis képességével a legszorosabb összefüggést egy thioredoxin és egy l-cys-peroxiredoxin enzim szintje mutatta, az előbbi a tenyésztés korai, az utóbbi a tenyésztés késői szakaszában.

Thibaud-Nissen és munkatársai (2003) szója szikleveleket helyeztek 2,4-D tartalmú táptalajra. 21 nappal később az explantumok felszínén szomatikus embriók fejlődtek. Az explantumokat kettévágva az embriogén és a nem-embriogén felszín elkülöníthető volt. A kétfajta explantumrészben összehasonlították a génkifejeződést a tenyésztés különböző időpontjaiban DNS „microarray” („DNS chip”) technológia segítségével. A „microarray” 9280 cDNS-t tartalmazott. A génexpressziós változásokat csoportosítva különböző mintázatok voltak megfigyelhetőek. Megállapítható volt, hogy a szomatikus embriófejlődés indukciós szakaszában az oxidatív stresszel, a sejtfal átalakulással és a sejtosztódással kapcsolatos gének szintje növekedett meg jelentősen (első hét nap), majd a sejtosztódási aktivitás csökkent, és a védekezési gének expressziója növekedett (7-14 nap).

Rensing és munkatársai (2005) embriogén ciklámen sejt kultúrát hoztak létre és annak különböző fejlődési állapotaiból vettek mintát. Ezeket a mintákat együttesen egy normalizált cDNS könyvtár előállítására használták fel, majd elkezdték a könyvtárban található cDNS klónok szisztematikus szekvenálását („EST” analízis). 2083 cDNS-t szekvenáltak meg, melyek jelentős része (kb. ezer darab) olyan transzkriptumot reprezentált, melyet korábban már összefüggésbe hoztak a szomatikus embriogenezissel.

4.2. OXR1, egy oxidatív stresszrezisztencia gén

A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben indukált szomatikus embriogenezis során azonosított gének közül a feltételezett funkció és expressziós mintázat alapján kiválasztottunk egy gyakorlati szempontból ígéretesnek ítélt lucerna cDNS-t, mely az emberi OXR1 (oxidation resistance 1) génnel mutatott homológiát. Ezt a gént Volkert és munkatársai 2000-ben azonosították, melynek legfőbb tulajdonsága az volt, hogy terméke kivédte a DNS-t érő oxidatív károsodást *Escherichia coli*-ban (Volkert és mtsai. 2000). Az OXR1 egy olyan konzervált géncsalád tagja, mely csak az eukariótákban található meg, a prokariótákban nem. A szerzők kimutatták, ha az OXR1 gén élesztő homológját (scOXR1) elmutáltatják egy haploid élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) törzsben, akkor a mutáns törzs tízszerre érzékenyebb lesz hidrogén-peroxid kezelésre, mint a vad típusú törzs (Volkert és mtsai. 2000).

További kutatásokból kiderült, hogy az emberi OXR1 fehérje képes visszaállítani az scOXR1 génhiányos haploid mutáns élesztőtörzs hidrogén-peroxiddal szembeni érzékenységét a vad típusú törzs szintjére, de csak abban az esetben, ha a fehérjét ellátták mitokondriális célszekvenciával (Elliott és mtsai. 2004). Következtetésük szerint az OXR1 fehérje az emberi és élesztő mitokondriumban védelmet nyújt a reaktív oxigéngyökök károsító hatásával szemben.

Durand és munkatársai arra voltak kíváncsiak, hogy emberben a humán OXR1 fehérjének van-e homológja, és ha igen, az hasonlóan védő funkciót tölt-e be. Az NCOA7 (nuclear coactivator) elnevezésű gén, mely egyben egy ösztrogén receptor kapcsolt fehérjét kódol (Durand és mtsai. 2007) nagyfokú homológiát mutatott vele, s kutatások szerint szintén védelmet nyújt oxidatív károsodással szemben *Escherichia coli*-ban.

Muslicában (*Drosophila melanogaster*) az OXR1 gén 7 izoformája fejeződik ki (L82A-G) és egy a teljes lókuszban hiányos mutáns letálisnak bizonyult az imágó vedlés képességének elvesztése miatt (Stowers és mtsai. 1999).

Egérben a homológját (C7) a sejtek extracelluláris mátrixhoz történő kapcsolódása alatt indukálódott gének keresése közben azonosították (Fischer és mtsai. 2001). Egy újabb publikáció szerint egér retinában a C7 fehérje szerepet kap hiperoxikus stressz során a fotoreceptorok megvédésében (Natoli és mtsai. 2008). A szem érhártyáján

belül ugyanis hiányzik a fotoreceptorokhoz oxigént szállító véráramlás önszabályozása. Így minden olyan tényező, mely csökkenti a fotoreceptorok oxigén fogyasztását, beleértve a fényadaptációt vagy betegség miatti fotoreceptorszám csökkenést, növeli a retina külső részében az oxigénnyomást. A napokig-hetekig tartó megemelkedett oxigén szint toxikus az ideghártya számára és feltehetően ez okozza a folyamatos retina degenerációt idősebb korban. A C7 fehérje tehát a fent említett körülmények között késlelteti a fotoreceptorok pusztulását.

Az eukarióta OXR1 gének különböző méretű fehérjéket kódolnak, de mindannyian tartalmazznak egy ~300 aminosavból álló domént a fehérje C-terminálisán. Mivel a domén megegyezik az élesztőben talált teljes OXR1 fehérjével, feltehetően ez a domén felelős (TLD domén) a emberi és az élesztő OXR1 fehérjék oxidatív védő szerepéért.

4.2.1. OXR1 génkifejeződés

Az OXR1 génkifejeződését különböző emberi szövetekben vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy több géntermék (2.9 és 4.9 kb, idegszövetben pedig 2.9 és 5.1 kb) is átíródik a OXR1 génről, ahol általában a 4.9 kb-s géntermék magasabb kifejeződési szintet mutat a kisebb géntermékhez képest. Viszont a nagy légzési kapacitású szövetekben (szívben, agyban és vázizmokban) hasonlóan erős kifejeződésű a 2.9 kb-s géntermék is (Elliott és mtsai. 2004).

Az NCOA7 (OXR1 homológ) gén emberi szövetekben konstitutív génkifejeződést mutat (Durand és mtsai. 2007).

4.2.2. OXR1 lokalizáció

Az egér homológ C7 fehérje C-terminálisa ellen termeltett C7C antitest felismeri az emberi és élesztő OXR1 fehérjét, így segítségével megállapították, hogy az emberi OXR1 fehérje HeLa és Hep2, valamint majom COS sejtekben mitokondriális lokalizációjú (Elliott és mtsai. 2004). Oxidatív stresszkezelést követően a fehérje

megjelenik a citoplazmában is, melyre két lehetséges magyarázattal szolgálnak: 1) nem tud minden fehérje a mitokondriumba szállítódni, 2) a fehérjének különböző citoplazmatikus izoformái is léteznek. Ez utóbbit alátámasztja, hogy stresszt követően több jel is megjelenik Western-bloton.

Az emberi OXR1 homológ NCOA7 fehérje citoplazmában és sejtmagban is lokalizálódik, ösztrogén kezelés hatására azonban feldúsul a sejtmagban, a citoplazmában pedig csökken a fehérjemennyiség szintje. Ez a folyamat valószínűleg összefügg azzal a ténnyel, hogy az ösztrogén anyagcsere reaktív oxigén gyököket generál a sejtmagban, ezáltal DNS károsodást idéz elő (Rajapakse és mtsai. 2005).

Az egér homológ C7 fehérje lokalizációja számos rágszáló sejtvonalban sejtmagvacská lokalizációt mutat (Fischer és mtsai. 2001).

A hiperoxíának kitett egér retinavizsgálat során azt tapasztalták, hogy a C7 fehérje a hiperoxíának még ellenálló fotoreceptorokban mitokondriális lokalizációjú, ám a pusztuló sejtekben megjelenik a sejtmagvakban (Natoli és mtsai. 2008). Ez arra engedte őket következtetni, hogy a fehérje képes mozogni a sejten belül, s megjelenni a magban közvetlenül a DNS fragmentálódás előtt.

4.2.3. OXR1 stresszválasz

Emberi sejtekben hőstressz hatására a OXR1 fehérje szintje 1 órán belül emelkedni kezdett, 2.5 óránál elérte a maximumot, majd 4.5 óránál csökkenni kezdett. Hidrogén-peroxid kezelés hatására hasonló emelkedést tapasztaltak a fehérje mennyiségében 4 óránál bekövetkező maximummal, és 5 óránál kezdődő lecsengéssel (Elliott és mtsai. 2004). Elliott és munkatársai következtetése szerint a OXR1 fehérje egy olyan fehérjecsalád tagja, mely többszintű stressz esetén is stresszválással bír.

Noha az emberi homológ NCOA7 fehérje szintén képes a DNS károsodást megelőzni, kifejeződése nem indukálható hidrogén-peroxid kezeléssel (Rajapakse és mtsai. 2005).

Élesztők esetében az scOXR1 géntermék szintje hőstressz során az első 15 percben megemelkedett, majd 45 percen belül visszatért a stresszt megelőző szintre (Elliott és mtsai. 2004). Ez a mintázat feltűnően hasonlít az élesztő HSP12 hősokk

génjének felfutási és lecsengési mintázatához (Praekelt és mtsai. 1990), s mindez detektálható volt fehérjeszinten is. Hidrogén-peroxid kezelésnek kitett élesztő sejtek esetében a génkifejeződés szintén gyorsan emelkedett az első 15 percben, de később sem tért vissza normál szintre a kísérlet ideje alatt (Elliott és mtsai. 2004).

A C7 gén expresszióját vizsgálták hiperoxia-érzékeny és hiperoxia-rezisztens egér retinában (Natoli és mtsai. 2008). A retinaválasz hiperoxia stressz során akut és krónikus szakaszokra osztható, ahol az első időben a fotoreceptorok rezisztensek, majd érzékenyek lesznek az oxidatív károsulással szemben. A C7 fehérje expressziója mindaddig emelkedett szinten marad (3.3-szorosan felülszabályozott), amíg a fotoreceptorok képesek ellenállni a hiperoxikus stressznek, majd a fotoreceptorok pusztulásának kezdetekor expressziója a normál szint alá süllyed (-2.6- szorosán alulszabályozódik).

5. Célkitűzések

Kísérleteink során az alábbi alapvető kérdésekre kerestük a választ:

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

A fenti kérdésekre adott válaszokat követően a kiválasztott Oxprot gén/fehérje részletesebb vizsgálatával kapcsolatban pedig az alábbi kérdéseket tettük fel:

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

6. Alkalmazott anyagok és módszerek

6.1. A kísérleti növények és sejt kultúrák

6.1.1. Növénykultúrák

6.1.1.1. Növénykultúrák fenntartása

A *Medicago sativa* L. ssp. *varia*; embriogén A2 genotípusú növényeket steril körülmények között, szilárd MS (Murashige és Skoog 1962) táptalajban 22°C-on, 16:8 órás fotoperiódus mellett tartottuk fent.

Az *Arabidopsis thaliana* L. esetében kísérleteink során Columbia ökotípus, vad típusú (Col-0) és T-DNS inszerciós (SALK Institute) mutánsokkal dolgoztunk. A SALK gyűjteményből származó N593924 és N124884 mutánsok esetében pROK2 vektorral (Baulcombe és mtsai, 1986.) generálták a mutánsokat, ami kanamicin rezisztenciát eredményez. A növényeket steril körülmények között 0.5% szacharóz tartalmú 1/2MS táptalajon növesztettük 22 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában 8 óra fény / 16 óra sötét periódus mellett. A mutánsok kiválogatása esetén a táptalajt a rezisztencia génnek megfelelő antibiotikummal egészítettük ki. Üvegházban növesztett növényeknél 8 óra fény/16 óra sötét megvilágítási körülményeket és 22 °C hőmérsékletet alkalmaztunk

6.1.1.2. Növénykultúrák stresszkezelése

Stresszindukciós kezelésnél Manuela Jurca a három hetes *Arabidopsis* csíranövényeket az alábbi vegyszerekkel kiegészített alap táptalajra helyezte egy membrán segítségével, majd 1 és 24 óra elteltével mintát vett a növényekből.

sötét+etilén (ethephon 10 mg/L)

ABS (100 µM)

Glükóz (300 mM)

NaCl (300 mM)

PQ (25 µM)

Hideg (4 °C)

SA (10µM)

Szacharóz (8%)

PEG (30 %)

A lúdfű mutánsok és vad típus csíráztatási tesztjéhez az alábbi körülményeket használtuk, s a vizsgálatot legalább 100 maggal vagy csíranövénnel végeztük.

Fény (8 óra fény/ 16 óra sötét)	Sötét (24 óra sötét)
Sötét+etilén (ethephon 10 mg/l)	Hideg (4 °C)
ABS (0.5 µM)	Glükóz (150mM)
Mannitol (300mM)	Szacharóz (8%)
NaCl (150mM)	CdCl ₂ (100µM)
H ₂ O ₂ (2 mM)	PQ (0.3 µM)
2,4-D (0.1 mg/l)	SA (0.5mM)

6.1.2. Sejtkultúrák

6.1.2.1. Sejtkultúrák fenntartása

A *Medicago sativa* L. ssp. *varia*; embriogén genotípusból származó sejtsuszpenziót hetente oltottuk át 0.2 µM 2,4-diklórfenoxiecetsavat (2,4-D) és 1 µM kinetint tartalmazó folyékony MS táptalajba.

Az *Arabidopsis thaliana* (Col-0) sejtsuszpenziós kultúrát MS tápoldatban 1 mg/L 2,4-D (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és 0.2 mg/L kinetin jelenlétében tartottuk fent 22 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában, hetente cserélve a tápoldatot.

Az *Agrobacterium*-közvetített sejtsuszpenzió transzformálásánál a növény transzformáláshoz használt *Agrobacterium* törzseket alkalmaztuk Ferrando és munkatársai (Ferrando és mtsai. 2000) által leírt módon. Az MsOxprot-HA fúzionáltatott gént a GATEWAY rendszerű pH3-DEST-3HA vektor hordozta.

6.1.2.2. Sejtkultúrák stresszkezelése

Az *Arabidopsis* és *Medicago* sejtsuszpenzióknál alkalmazott hipoxia stresszkezelés 15ml csövekben történt úgy, hogy a csöveket teljesen megtöltöttük azonos sűrűségű, 3 napos sejtsuszpenzióval, majd körbeforgó himbára helyeztük. A mintavételezési időpontokban (0-1/2-1-2-4-8-24h) mindig egy teljes csövet leszűrtünk és a sejteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk.

6.1.3. Lucerna levélprotoplaszt izolálás és tenyésztés

4-6 hetes steril körülmények között nevelt lucerna (*M. sativa* ssp. *Varia* A2) növényekről kb. 1 g levelet gyűjtöttünk, majd azokat K75 oldatban (Kao és Michayluk 1980) apró darabokra vágtuk steril borotvapengével. A levéldarabokat K75 oldattal átöblítettük. A protoplaszt izolálást K75 tápoldatban oldott enzimkeverékkel (0.5 % Cellulase Onozuka R10, 0.5 % Macerozyme R10, 0.25 % Rhozyme) 16 óráig, 22°C-on, sötétben végeztük. A protoplasztokat 60 µm pórusátmérőjű szűrő segítségével megtisztítottuk, majd a levéldarabokat addig mostuk K75 oldattal, míg belőlük protoplasztok kiszabadulását észleltük. A protoplasztokat 3 percig 300 g-vel centrifugáltuk. A leülepedett protoplasztokat K75 tápoldatban szuszpendáltuk, kétszer ugyanezzel a tápoldattal mostuk és centrifugáltuk. Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot, majd a sejtsűrűséget 10^5 protoplaszt/ml-re állítottuk. A K75 tápoldatban tenyésztett 5 ml-nyi protoplasztot ezután kétfelé osztottuk, így kb. 250-250 ezer protoplasztot 0.5mg/L zeatin és a két különböző (1 és 10µM) 2,4-D koncentráció jelenléte mellett tenyésztettünk 4 napig. A negyedik napon a protoplasztokat leülepítettük, a tápoldatot eltávolítottuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk.

6.1.4. Lucerna levélúsztatásos kísérlet

3-4 hetes steril körülmények között nevelt lucerna (*M. sativa* ssp. *Varia* A2) növényekről a leveleket levélnyelüknél levágtuk és 0.02% Triton-X-100-at tartalmazó K75 tápoldatban 15 percig mostunk. Ezután friss, detergens mentes tápoldattal leöblítettük, majd a levélnyelet levágtuk, s a levélkéket 1mg/L zeatin+1 µM 2,4-D valamint 1mg/L zeatin+10 µM 2,4-D-t tartalmazó K75 tápoldatban sötétben tenyésztettük. A levelekből naponta mintát vettünk, melyeket folyékony nitrogénben lefagyasztottunk (1 minta: 3 db lucerna levéllemezke).

6.1.5. Lucerna mitokondrium izolálás

Az embriogén lucerna sejtszuszpenziót (*M. sativa* ssp. varia A2) leszűrtük, majd 3 gramm tenyészetet 40-60 µm átmérőjű fátylon eldörzsöltünk 10ml jéghideg 1XGR pufferban (50mM HEPES/KOH pH=7.5, 0.33M szorbitol, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 2mM EDTA, 5mM Na-aszkorbát, 1%BSA), s ezuán 2000g-n fugáltuk 3 percig. A felülúszót újra fugáltuk 18000g-vel, s a csapadékot ecsettel felszuszpendáltuk 5 ml mitokondrium izoláló pufferben (0.4 M mannitol, 0.5% BSA, 10mM K-foszfát puffer, pH=7,2), ezután 3 percig 2000g-vel fugáltuk. A csapadékot felvettük 600 µl mitokondrium izoláló pufferben, majd rárétegeztük percoll gradiensre (1ml 45% percoll, 1ml 25% percoll, 1ml 13,5% percoll +0,5% BSA, 0,25M szacharóz). A percoll gradiensre rétegzett mitokondriumot 20 pecig 12000 rpm-en fugáltuk, majd a tiszta mitokondriumokat leszívtuk a 45% és 25% interfázisánál. Ezután a mitokondriumokat izoláló pufferral többször mostuk, végül fehérjét izoláltunk belőle.

6.1.6. T-DNS inszerciós *Arabidopsis* mutánsok kiválogatása

A SALK Intézettől megrendelt T-DNS inszerciós mutánsok (N593924, N124884) leveléből genomi DNS-t tisztítottunk standard módszerek alapján, majd azon T-DNS specifikus (LB) illetve genomi primerekkel PCR-t hajtottunk végre. A felhasznált primerek szekvenciáit a 6-1. táblázat tartalmazza.

Cél	5' primer	3' primer
N593924	CCCCATTGCCATTAACATCCAA	CAATCCATCGAAAGATCATCAAAAAA
N124884	AAGCCTCGCTGTAAAAACCTC	TGGGGTTATTCTCTGAATGTGAC
T-DNS(Lba1)	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	

6-1. Táblázat: A T-DNS inszerciós mutánsok homozigóta vonalainak kiválogatásához használt primerek

6.2. Molekuláris biológiai módszerek

Az alapvető molekuláris biológiai technikákat standard módszerek alapján (Sambrook és mtsai. 2000) végeztük el. Csak a dolgozat szempontjából lényeges, illetve speciális módszereket tárgyaljuk részleteikben.

6.2.1. DNS-vizsgálati módszerek

6.2.1.1. Baktérium kultúrák

Munkánk során az E. coli XL-1 Blue, BM25.8 és DB3.1 törzseit használtuk. A kultúrákat LB táptalajon (10 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat, 5 g/L NaCl) növesztettük. Az XL-1 Blue baktériumokat 12.5 mg/l tetraciklin jelenlétében 37°C-on tenyésztettük. A BM25.8 törzs esetében a tenyésztési hőmérséklet 31°C volt és kanamicin és karbenicillin (100-100 mg/l) antibiotikumot használtunk a szelekcióra. A baktérium törzsek tárolása -80°C-on LB tápközegben, 25%-os glicerinnel jelenlétében történt. Az optimális fág fertőzés eléréséhez az LB tápoldathoz 0.2% maltózt és 10mM MgSO₄-ot adtunk.

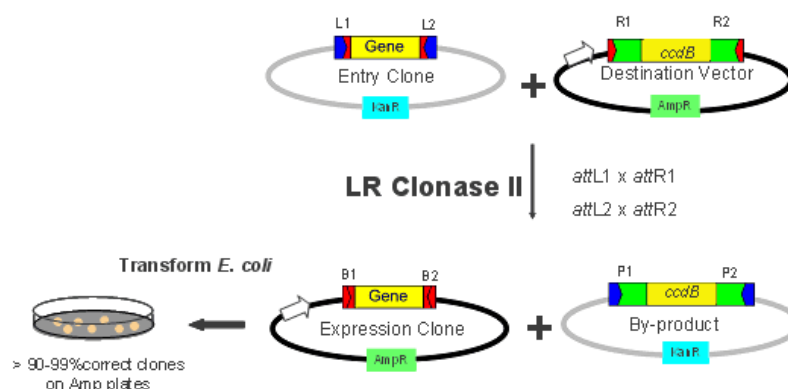
A baktériumok plazmid DNS-sel való transzformálását hagyományos hősokk (42°C 1-2 perc) kezeléssel végeztük.

6.2.1.2. GATEWAY rendszer

A Gateway® rendszer a gén ligálásához az expressziós vektorba lambda fág alapú hely-specifikus rekombinációt használ restriktív endonukleázok és ligázok helyett. (6-1. Ábra) A Gateway® technológia alapja a DNS rekombinációs szekvenciák (attL, attR, attB és attP), és az LR és BP Clonase II enzim keverékek, melyek véghezviszik a lambda rekombinációs reakciót. A gén bevitele a célvektorba mindössze két lépés. Első lépésként a gént be kell juttatnunk Gateway® entry vektorba PCR- vagy restriktív-alapú klónozás segítségével (pDONR és a pENTR vektorok). Második lépésként az entry klónból, in vitro, a Gateway LR Clonase II enzim keverék segítségével egy lépésben,

bármelyik Gateway® expressziós vektorba (pDEST) átvihetjük a vizsgálandó gént. Az att helyek közötti rekombinációval a vizsgálandó gén és a célvektorban található ccdB (sejthalált okozó) gén kicserélődnek egymással. A vektorok különböző antibiotikum rezisztenciája, illetve a ccdB gén biztosítja, hogy csak a vizsgálandó gént tartalmazó célvektort tartalmazó telepek nőjenek ki. A használt GATEWAY rendszerű plazmidokat

6-2. Táblázat tartalmazza.



6-1 Ábra. GATEWAY LR rekombinációs reakció (forrás: www.csertex.hu/index.php?page=mb_klonozas06)

Plazmid neve	Növényi marker	Bakteriális marker	Epitóp jelölés
pENTR4		Kanamicin	
pENTR2b		Kanamicin	
pDONR201		Kanamicin	
pDEST17		Ampicillin	6 x His
pH3-DEST-3HA		Ampicillin	3X HA
pCup-DEST_Nui		Ampicillin	

6-2. Táblázat. A használt GATEWAY rendszerű plazmidok

6.2.1.3. Plazmid tisztítás

A plazmidokat éjszakán át növesztett 2 ml baktérium kultúrából tisztítottuk. Ehhez részben a módosított alkali-lízis módszert (Felicello és Chinali 1993) használtuk, majd áttértünk az E.Z.N.A. plazmid tisztító kit-ek (OMEGA BIO_TEK) használatára.

6.2.1.4. A cDNS könyvtárak létrehozása

A cDNS könyvtárak elkészítését a CLONTECH cég „SMART[™] PCR cDNA Library Construction Kit” felhasználásával végeztük.

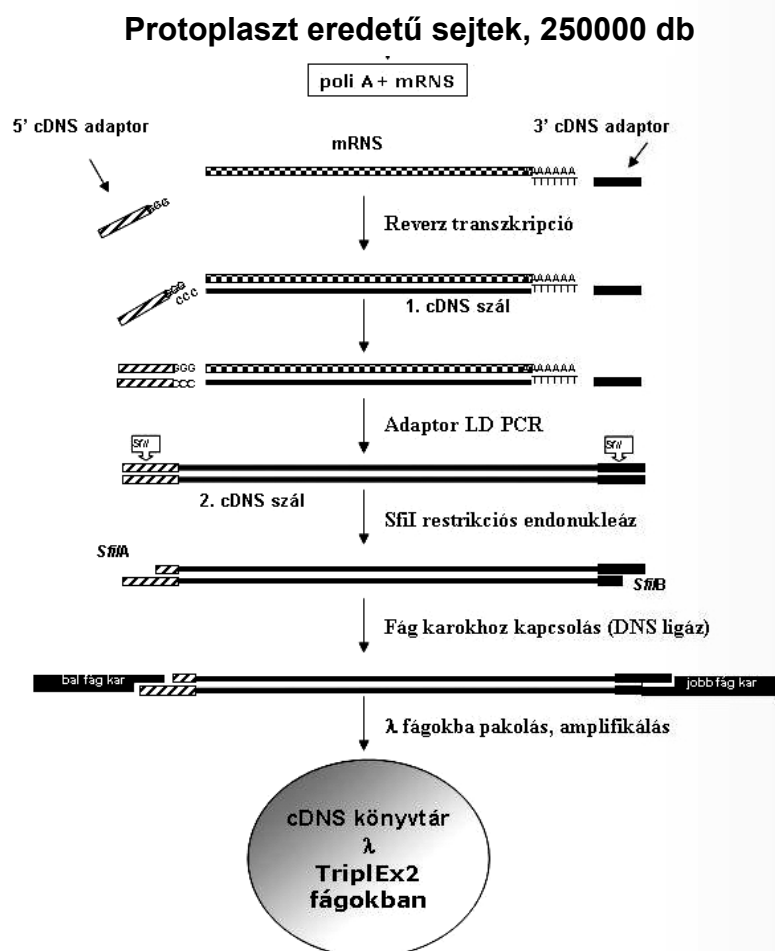
Megközelítőleg 250 000 izolált sejtől indultunk ki, amelyeket felhasználásig a kit-hez tartozó lízis pufferben tároltunk -80°C-on. Az mRNS tisztítást a lentebb leírtak szerint végeztük el. A cDNS szintézist a kitben található, az mRNS-ek poli-A végéhez kötődő, „CDS III/3’ PCR Primer” és az mRNS-ek 5’ végéhez kapcsolódó „SMART III Oligonucleotid” jelenlétében végeztük el „PowerScript” (CLONTECH) reverz transzkriptáz felhasználásával. A cDNS második szálát a gyártó utasításai szerint, „CDS III/3’ PCR Primer” és „5’ PCR Primer” segítségével, PCR reakcióban szintetizáltattuk meg, „Advantage2 PCR Kit” (CLONTECH) felhasználásával.

A létrehozott cDNS molekulák a két végükön két különböző Sfi I felismerő helyet (Sfi I A illetve B) hordoznak, a beépített primer szekvenciáknak köszönhetően. A „SMART” cDNS szintézis és cDNS könyvtár készítés elvét a 6-2. Ábra foglalja össze.

A PCR segítségével megsokszorozott cDNS darabokat SfiI enzimmel emésztettük, méret szerint frakcionáltuk és λ TriplEx2 vektorba építettük, pontosan követve a kit gyártójának utasításait. A sikeres ligálás után burokfehérjéket adtunk a λ TriplEx2 vektorhoz, így létrehoztuk magát a fágot. A pakolást a STRATAGEN cég „Gigapack Gold III Packaging Extract” termékével végeztük a hozzá tartozó protokoll szerint. A kész fágokat alikvotokba osztottuk 4°C-on tároltuk (maximum 1 hónapig) vagy 7% DMSO jelenlétében lefagyasztottuk és -80°C-ra helyeztük.

A cDNS könyvtárak jellemzéséhez egységes baktérium gyepet fertőztünk a hígított fágokat tartalmazó oldattal. Megszámoltuk a képződő fág plakkokat és az alábbi képlettel megkaptuk a fág titert („plakk forming unit” = pfu).

$$\text{pfu/ml} = \text{plakkok száma} \times \text{hígítási faktor} \times 10^3 \text{ } \mu\text{l/ml} / \text{fág szuszpenzió térfogata } \mu\text{l-ben}$$



6-2 Ábra. A SMART PCR-alapú cDNS szintézis és cDNS könyvtár készítés vázlata.

A λ TriplEx2 vektorban, mint más λ expressziós vektorokban is, a klónozó hely be van ágyazva a β -galaktozidáznak az α -polypeptid láncát kódoló szekvenciájába, ez lehetővé teszi a lacZ α -komplementációs vizsgálatot. Az LB/MgSO₄ táptalajt tartalmazó 90 mm átmérőjű lemezeket lemezenként 50-50 μ l IPTG (100 mM Isopropyl β -D-tiogalaktopiranozid vízben) és X-gal (100 mM-os, dimetilformamidban oldva) hozzáadásával készítettük el. A rekombináns fágok által okozott plakkok fehérek maradtak, a nem-rekombinánsok kékek lettek.

A cDNS könyvtár megsokszorozását standard módszerek szerint végeztük el (Sambrook és mtsai. 2000), amit a cDNS könyvtár készítéséhez használt kit leírása is tartalmazott. A λ TriplEx2 phagemid klónok átalakítása pTriplEx2 plazmidokká szintén a kit-ben leírt módon történt, E. coli BM25.8 törzs fertőzésével.

6.2.1.5. A cDNS-ek szekvenálása

A plazmidokban a cDNS inszert méretét PCR reakcióval megvizsgáltuk (primerek a „TEX 5” TCCGAGATCTGGACGAG és „TEX 3” TAATACGACTCACTATAGGGC voltak) és a 200 bp-nál nagyobb méretű inszertet hordozó plazmidokat tartottuk meg. A szekvenálást a MACROGEN cég (Dél-Korea) végezte el, a piroszekvenálás elve alapján.

6.2.1.6. In silico szekvencia analízis:

A cDNS inszerteket pGEM-T vektorba (Promega, Madison, WI, USA) klónoztuk, s T7 szekvenáló primert használva ABI automata DNS szekvenáló segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) szekvenáltattuk meg. A szekvenciákat a BLAST kereső segítségével a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> honlapon elérhető DNS adatbázisokkal vetettük össze. A gének elnevezése a lucerna cDNS szekvenciák *Arabidopsis* génekkel fennálló homológiája alapján történt. Ehhez a GO nevezéktani kereső rendszert használtuk (www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/), s a keresési eredményeket az Arabidopsis “GoSlim terms” segítségével egyszerűsítettük.

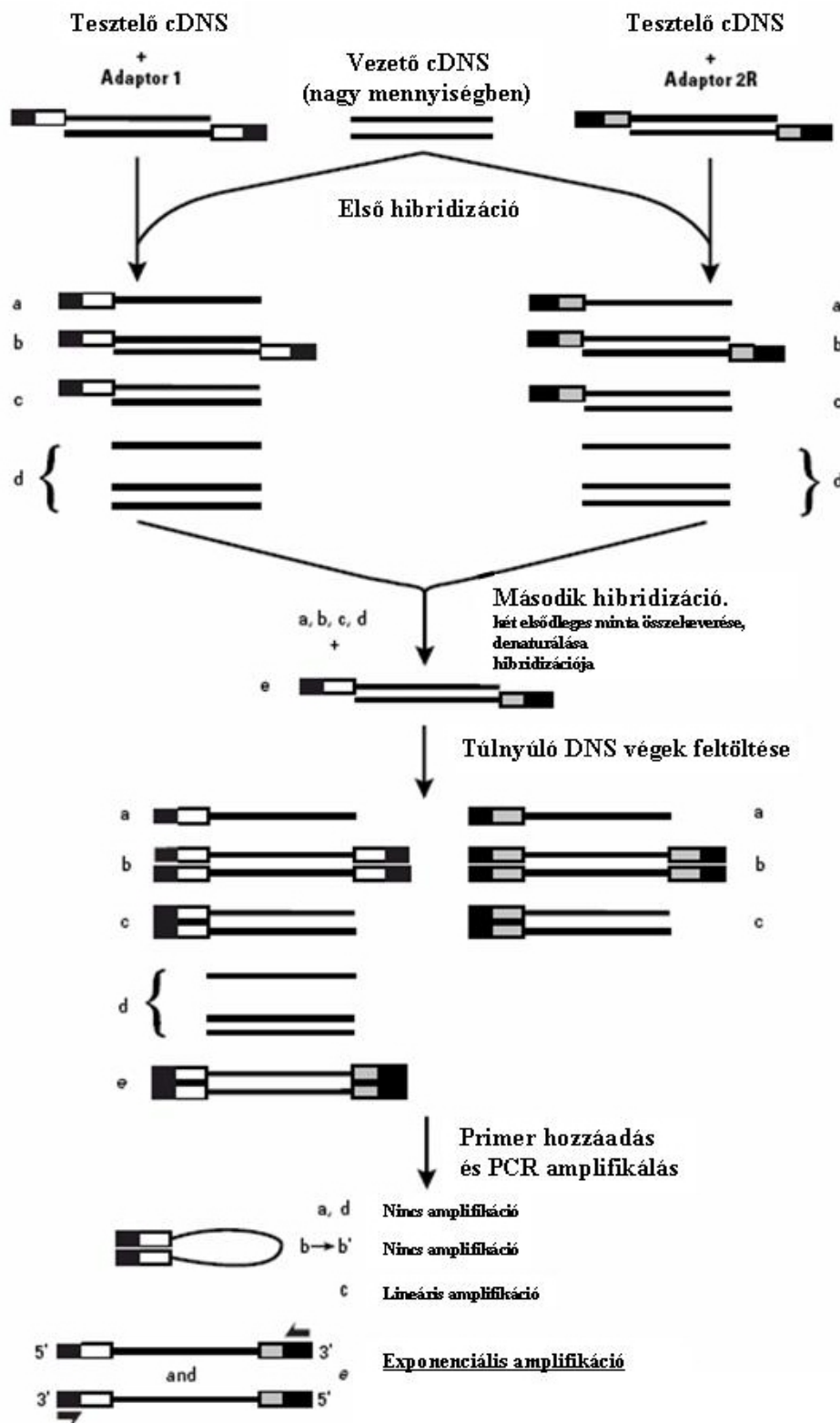
6.2.1.7. cDNS kivonás

Az 1 és 10 μ M 2,4-D jelenlétében négy napig nevelt protoplasztokból a lentebb leírt módon mRNS-t tisztítottunk. A másodlagos cDNS szál szintézisét és a cDNS kivonást a CLONTECH cég „PCR-Select cDNA Subtraction Kit” és „Advantage2 PCR Kit” felhasználásával végeztük el a gyártó utasításai szerint. A szelektív PCR amplifikáción alapuló cDNS kivonás elvét a 6-3. Ábra foglalja össze.

A cDNS kivonás eredményeként kapott cDNS fragmentumokat pGEM-T vektorba (PROMEGA) építettük, majd a DNS-vel *E. coli* XL-1 Blue sejteket transzformáltunk.

A rekombináns klónokat hordozó baktériumokat szelektív táptalajra szélesztettük és 500 véletlenszerűen választott kolóniából plazmid DNS-t tisztítottunk. A plazmid koncentrációt egységesen 200 ng/ml értékre állítottuk be, majd 2-2 μ l plazmid oldatot nylon (Hybond N, AMERSHAM) filterekre vittünk fel egy „DNS array” készítő robot segítségével. Négy azonos filtert készítettünk. A négy filter a CLONTECH cég „PCR Select Differential Screening” kit-jének felhasználásával négy eltérő cDNS próbával hibridizáltuk (kivont, fordítva kivont és nem kivont cDNS minták, lásd Eredmények fejezet). A cDNS-eket „random priming” módszerrel radioaktív dCTP (α -P³² dCTP; 3000 Ci/mmol) beépítésével jelöltük („Megaprime DNA Labelling Kit”, AMERSHAM). A hibridizációs körülmények az alábbiak voltak (65 °C éjszakán át 6xSSC standard hibridizációs oldat, mosás 2xSSC, 0,1% SDS kétszer 10 perc szobahő, majd 0,2xSSC, 0,1% SDS kétszer 30 perc 62 °C). A jeleket röntgenfilmen detektáltuk.

A kivont cDNS próbával erős, a többi próbával gyenge jelet adó plazmidokat tisztítottuk és szekvenáltuk.



6-3. Ábra A szelektív PCR amplifikáción alapuló cDNS kivonás elve, a CLONTECH cég „PCR Select cDNS Subtraction Kit” használatával.

6.2.2. Génexpressziós vizsgálatok

6.2.2.1. RNS tisztítás

Egységnyi mennyiségű ($2-2.5 \times 10^5$) protoplaszt eredetű sejt hírvivő RNS (mRNS, messenger RNS) tartalmát „Dynabeads mRNA Direct Kit” alkalmazásával izoláltuk (DYNAL). A gyöngyökhöz kapcsolt mRNS populációt RNáz mentes DNázssal (SIGMA) kezeltük, hogy elkerüljük a genomiális DNS szennyeződést.

Sejtkultúrák esetében először a teljes RNS-t a sejtek guanidinium jelenlétében történő feltárását követően litium-acetátos kicsapással tisztították Györgyey és munkatársai (Györgyey és mtsai. 1991, 1997). Az általuk a rendelkezésünkre bocsátott teljes RNS mintákból (5-5 µg) a fent leírt módon mRNS-t tisztítottunk.

Az izolált mRNS DNS mentességét PCR (polimeráz láncreakció) reakcióval aktin primerek segítségével ellenőriztük úgy, hogy az mRNS mennyisége hétszerese volt a cDNS szintézishez használt mennyiségnek. Amennyiben nem kaptunk jelet, az RNS-t DNS mentesnek tekintettük.

6.2.2.2. cDNS szintézis

Az egyszállú cDNS szintézisét RevertAid M-MuLV reverz transzkriptázzal (FERMENTAS) 40u RiboLock ribonukleáz inhibitor (FERMENTAS) jelenlétében végeztük a gyártó utasításai szerint, oligo-dT primert használva.

6.2.2.3. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR)

A vizsgálni kívánt gének relatív expresszióját valós idejű PCR-val, az APPLIED BIOSYSTEMS cég „ABI Prism 7000” szekvencia detektáló rendszerével végeztük, ugyanezen cég „SYBR-green PCR Master Mix” reakció elegyének felhasználásával a cég által javasolt módon. A génspecifikus primereket a „Primer Express” szoftver segítségével terveztük meg. A használt primerek listáját és szekvenciáját az 6-3. Táblázat

tartalmazza. Az *msserk1* primer szekvenciák megegyeztek a Nolan által közöltekkel (Nolan és mtsai. 2003). A primerek specifikását a PCR termékek végpont disszociációs analízisével és esetenként a PCR termékek szekvenálásával állapítottuk meg. A valós idejű PCR reakciókat három ismétlésben végeztük, majd a kapott eredményeket az ún. komparatív küszöb ciklus (ΔCT) módszerrel értékeltük, a gyártó (APPLIED BIOSYSTEMS) útmutatásai szerint. Az adatok normalizált relatív értékeket mutatnak, ezért a szórást nem tüntettük fel, de az minden esetben 4% alatt volt. Az Oxprot gének esetében a szórás is felkerült az ábrákra.

Cél	5' primer	3' primer
<i>msserk1</i>	TCCCTACATGGCTAATGGAAGTG	TGGCCAATCTAGTGGTTCTTGAT
<i>msactin B</i>	TCCTAGGGCTGTGTTTCCAAGT	CCAACCATGACACCGGTATG
<i>mslec1</i>	CGTGAGCTTGAAGGTGATCGT	CATACCCCTCTTTCCCAAAGG
<i>msgapdh</i>	ACAAACATGGGAGCATCCTTACTAG	GTTTTTACCGACAAGGACAAAGCT
1 2 <i>ARF</i>	GAGCTCGTCTACAAAAACATTCGAT	CCCATGATGTCCGGAGTCTT
1 11 <i>SET</i>	CAGAAAGATGAAATGGGTGACATTC	TTGAGTGGTAGTGGTGCCATCT
2 6 <i>RAB</i>	ACTTCCGATCGATCCAATTC	CGAGAAATTGACCCTTGACA
2 8 <i>EF</i>	ATCCAACCTCAAGGATGACC	CACTGGTGCATATCCGTTTC
2 16 <i>GST</i>	GAAGGTGGAAGGAACCTTTG	TAAGTCCGGTCTCCCAATTC
2 19 <i>ZF</i>	CCGCCTAAATGCTGCCAAT	TTCAGATCCACCCCCCTCTT
3 13 <i>PR</i>	TTGATGCAATTGATGAAGCA	GACCTTCAACCAATTTTCGCT
3 16 <i>WD</i>	TCTCGTCGCGATTGCTATAC	TGCTATGGGACGAGAGAGAG
5 16 <i>OXR</i>	GGTAGCCCTTGCCTCTCCAA	GAGTCACTCCCCAGCATTCTATTACT
5 17 <i>S3</i>	ATCAACCAAGCATCATCCTG	CTCTTTCCCAATCATCTCGG
5 20	CTTTCCATTTCCGGTGTTTC	CATTCATGCAATCGACAATG
<i>pTriplEx2</i>	TCCCGAGATCTGGACGAGC	TAATACGACGACTCACTATAG
AtAct2/8	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
AtGAPDH-2	AATGGAAAATTGACCGGAATGT	CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA
AtADH1	GAATCGCTGGTGCTTCTAGG	CTCAGCGATCACCTGTTGAA
RT-AtOxp	AGCAATGACCAATACGTCTCGTAC	TTTCTGCGTTGAGTGACCAT
RT AtNOS1	AACTTTGCCAACTCAATCGT	AGCCTTCAAGATGTCAATCC
RT AtHB1	TCATGTGTTGTGAATCAGCA	AACGACACCGTATTTAGAATGG
RT Mhb1	CGAGCATTTTGAGGTGACAA	AGCTTCTCCCCATGCATTC

6-3. Táblázat. A használt PCR primerek szekvenciái (5'-3').

6.2.3. Fehérje analízis

6.2.3.1. Bakteriális fehérje termeltetés és fehérje tisztítás

Az MsOxprot cDNS-eket hordozó pDEST17 konstrukciókat *E. coli* BL21 Rosetta baktériumokba transzfektáltuk, és a rekombináns fehérje termeltetését optimalizáltuk. Végősoron az expressziót 0.4 mM IPTG-vel indukáltuk és 28 °C-on végeztük.

Az indukciót követően a baktériumsejteket szonikálással feltártuk, majd az extraktumot 4 °C-on, 10000 g-vel, 20 percig centrifugáltuk, és elvégeztük a fúziós proteinek Ni-agaróz affinitás kromatográfiás tisztítását. Az expresszált fehérjék döntő hányada a felülúszó frakcióba került a centrifugálást követően, ami lehetővé tette a nagymennyiségű szolubilis, rekombináns proteinek tisztítását. A gyantához reverzibilisen kötődő proteinek növekvő koncentrációjú imidazollal eluáltuk. Az MsOxprot 6xHis-fúziós fehérje jelentős hányadát 250 mM imidazollal tudtuk eltávolítani a Ni-agaróz gyantáról. A frakciókat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk. A géleket Coomassie Brilliant Blue G-250-al festettük. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagens használatával (BIORAD), spektrofotométerrel (595 nm-en) határoztuk meg.

A legtisztább frakciókat 60% glicerinnel tartalmú pufferrel szemben dializáltuk, majd -20°C-on tároltuk. Ezeket a frakciókat antitest termeltetése céljából immunizáláshoz használtuk fel.

6.2.3.2. Ellenanyag előállítás

A poliklonális fehérje ellenanyagok előállítását nyulak bakteriális expressziós rendszerből tisztított (lásd fentebb) fehérjékkel történő immunizálásával állítottuk elő. Az immunizálást standard módszerek alapján az MTA SZBK Állatház munkatársai végezték el. A szérumot centrifugálással üleptítettük, majd az ellenanyagot a felülúszóból, az immunizáláshoz használt fehérje felhasználásával, affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

6.2.3.3. Immunológiai fehérje kimutatás (immunoblot vagy „Western” analízis)

- Növényi fehérjék feltárása

Immunológiai fehérje kimutatáshoz („Western” analízis) folyékony nitrogénben fagyasztott és felhasználásig -80°C-on tárolt növényi mintákat jégen tártuk fel kvarchomok és extrakciós puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM NaF, 60 mM β-glicero-foszfát) jelenlétében. Az extrakciós

puffer 1 mM PMSF-t (fenil-metil-szulfonilfluorid), 2 mM DTT-t (ditiotritol) és 10 µl/ml proteináz inhibitor keveréket (SIGMA) tartalmazott.

- Élesztő fehérjék feltárása

5 ml SD-Trp táptalajban egy éjszakán keresztül nőtt élesztőt lefugáltunk, jéghideg vízben mostuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. 100 µl 60°C-ra előmelegített Cracking puffert (8 M Urea, 5% w/v SDS, 40 mM Tris-HCl [pH6.8], 0.1 mM EDTA, 0.4 mg/ml Bromophenol blue, 10µl/ml β-mercaptoethanol, 30µl/ml Protease inhibitor solution, 1 mM PMSF) mértünk rá, 70°C-on 10 percig inkubáltuk, majd 80 µl üveggyöngy hozzáadásával 1 percig erősen vortexeltük. Fugálás után a felülúszót áttöltöttük újabb Eppendorf-csőbe, majd 3 perc forralás után SDS-gélen megfuttattuk.

A mintákban található fehérjéket molekula tömegük alapján SDS poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE) technikával elválasztottuk. Az elektroforézis végeztével a 10% poliakrilamidot tartalmazó gélből a fehérjéket PVDF membránra (MILLIPORE) vittük át („blottoltuk”). A membránt két órán keresztül szobahőmérsékleten telítettük 5% zsírszegény tejport és 0.05% Tween 20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-CL, pH8.0, 150 mM NaCl) pufferben. Ezt követően az elsődleges ellenanyaggal, 1 µg/ml IgG végkoncentráció mellett, két óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az alkalmazott elsődleges ellenanyag a lucerna MsOxprot fehérje esetén a teljes fehérje ellen termeltetett ellenanyag volt, mely előzőleg affinitástisztításon esett keresztül. Az elsődleges ellenanyaggal történt inkubáció után a membránt mostuk 0.2% Tweent tartalmazó TBS-sel. Mosás után a membránt peroxidáz enzimmal kapcsolt másodlagos ellenanyag tejporos oldatában inkubáltuk a gyártó (SIGMA) által javasolt koncentrációban. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátjával („Lumi-Light Western Blotting Substrate”, ROCHE) kezeltük a membránt, a lumineszcenciát pedig röntgenfilmmel detektáltuk.

6.2.3.4. Élesztő komplementálás

A lucerna és lúdfű Oxprot fehérje oxidatív stresszrezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatához élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) vad típusú N1-4 törzsét, és

az *oxr1*::URA3 mutáns N1-9 törzsét (Volkert és mtsai, 2000) használtuk fel kísérleteink során. Az MsOxprot és AtOxprot géneket először a pENTR2B vektorba illesztettük restriktációs-alapú klónozás segítségével, majd a Gateway LR Clonase II enzim keverék használatával a pCup-NuI-DEST élesztő expressziós vektorba (Molnár Gergő, Max Plank Institute, Köln) vittük át.

Hidrogén-peroxid érzékenység mérése: A kísérletet Ramotar és munkatársai (1991) leírása alapján végeztük. Az élesztő törzsek a 6-4. táblázatban felsorolt vektor konstrukciókat hordozták. Az SD-Trp táptalajban éjszakán át nöövő élesztő tenyészeteket másnap kb. 0.15 OD₆₀₀ sűrűségűre hígítottunk, majd folyamatos rázatás mellett 10µM CuSO₄ hozzáadásával kb. 0.8-1.0 OD₆₀₀ sűrűségűre növesztettünk. A vad és mutáns törzsek vektor kontrollként (a rézindukció és az SD-Trp táptalajon növekedés érdekében) pCup-NuI-GUS konstrukciót hordoztak. A sejteket ezután fugáltuk (5perc, 2500 rpm), egyszer mostuk steril vízben, majd PBS-ben (pH 7.4) felfuszpendáltuk. A mintákat 50, 100, 150 mM H₂O₂-vel kezeltük 1 órán keresztül, 30°C-on rázatás mellett. A kezelések után a sejteket PBS-ben hígítottuk, és SD-Trp + 10 µM CuSO₄ –et tartalmazó lemezekon hígítási sorozatban kikentük. Minden kísérletet háromszor végeztünk.

Plazmid neve	Bakteriális szelekciós marker	Élesztős szelekciós marker
pCup-NuI-GUS	AmpR	Trp
pCup-NuI-AtOxprot	AmpR	Trp
pCup-NuI-MsOxprot	AmpR	Trp

6-4. Táblázat. Az élesztő hidrogén-peroxid érzékenység mérésehez használt vektorok .

A komplementáció detektálása: Előzetes kísérletet végeztünk Demasi és mtsai. (2006) leírása nyomán, mely során 1-7mM H₂O₂-ot és 10µM CuSO₄-et tartalmazó YPD táptalajra kicsöppentettük a mutáns és vad típusú élesztő törzseket, s figyeltük, hogy látható-e valamilyen növekedésbeni különbség. Az 5mM H₂O₂-ot tartalmazó táptalajon éles különbséget fedeztünk fel a két törzs növekedése között, így ilyen körülmények között elvégeztük a komplementációs kísérletet. A fentebb említett MsOxprotot és AtOxprotot kifejező rézindukált élesztő törzseket egy éjszakán át növesztettük SD-Trp + 10mM CuSO₄ –et tartalmazó folyékony táptalajban, majd a kultúrákat 600nm-en mért 0.2 OD-re hígítottuk. Ezt követően azokból 1:5, 1:25, 1:125, 1:625-ös hígításokban 12µl-es

cseppeket helyeztünk a rézszulfátot és 5 mM H₂O₂-t tartalmazó táptalajra. A telepek 4 napon keresztül nőttek 30 °C-os termosztátban, majd a különbséget fényképen detektáltuk.

6.2.3.5. Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata élesztőben

A fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokat az élesztő kettős hibrid rendszerben pontosan a Fülöp és munkatársai (Fülöp és mtsai. 2005) által közöltek alapján végeztük el, a PJ69-4A-jelű élesztő törzsben (MATa trp1-901, leu2-3,112 ura3-52, his3-200 gal4delta, gal80delta GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ).

Az AtOxprot fehérjét kódoló cDNS-t a pGBT9 vektor DNS-kötő domént kódoló szakaszához illesztettük úgy, hogy a leolvasási keret fúziós fehérjét eredményezett. Az autoaktiváció leellenőrzése céljából ugyanezen cDNS-t beillesztettük pAD-GAL4-2.1 aktivátor vektorba is, s együttes kifejeztetésük PJ69-4A-jelű élesztőben nem mutatott His⁺ fenotípust, vagyis fehérje-fehérje kölcsönhatást. A sejtszuspenziós cDNS könyvtárat pACT2 aktivátor vektor (Durfée és mtsai. 1993) hordozta (forrás: Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport, MTA SZBK), s a mintegy 105 transzformánsból 39 klón mutatott His⁺ fenotípust utalva az AtOxprot és a pACT2 aktivátor doménjéhez fuzionált ismeretlen cDNS által kódolt fehérje közötti kölcsönhatásra.

6.2.4. Immunolokalizáció

Az immunlokalizációs vizsgálatokhoz MsOxprot-HA fúziós fehérjét túltermelő lúdfű sejtszuspenziós kultúrát használtunk fel. A sejteket 1% celluláz (Onozuka R-10, Yakult, Tokyo, Japan), 0.5% macerozim R-10 (Yakult, Tokyo, Japan) és 0.16% driszeláz (Sigma) tartalmú, 0.4 M mannitollal kiegészített MS tápoldatban emésztettük négy órán keresztül, majd 100 nM MitoTracker Orange (Molecular Probes) festékkel kezeltük sötétben, 20 percen keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket szobahőmérsékleten egy órán keresztül fixáltuk 3.7% formalin tartalmú MTBS (50 mM PIPES pH 6.9, 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA) oldatban. Ezután 0.01 M PBS pH 7.2

oldattal mostuk, majd a sejteket poli-L-lizinnel (Sigma) fedett tárgylemezre csepegtettük, és 20 percig 0.5% Triton-X-100-al kezeltük. Első ellenanyagként egér monoklonális anti-HA-t (Sigma) alkalmaztunk 1:200 hígításban PBS oldatban két órán keresztül 37 °C hőmérsékleten. Az első ellenanyag kimosása után Alexa 488-konjugált másodlagos ellenanyagot (Molecular Probes) adtunk a mintákhoz 1:800 hígításban, és egy órán keresztül 37 °C hőmérsékleten tartottuk azokat. Végül a sejteket Citifluor (Ted Pella Inc. CA, USA) oldattal fedtük. A citológiai vizsgálatokhoz Olympus FV1000 Confocal Laser Scanning mikroszkópot használtunk. A maximális nagyítás és felbontás elérése érdekében a megfigyelések nagy részében olaj-immersiós Plan NeoFluar 60x objektívet használtunk.

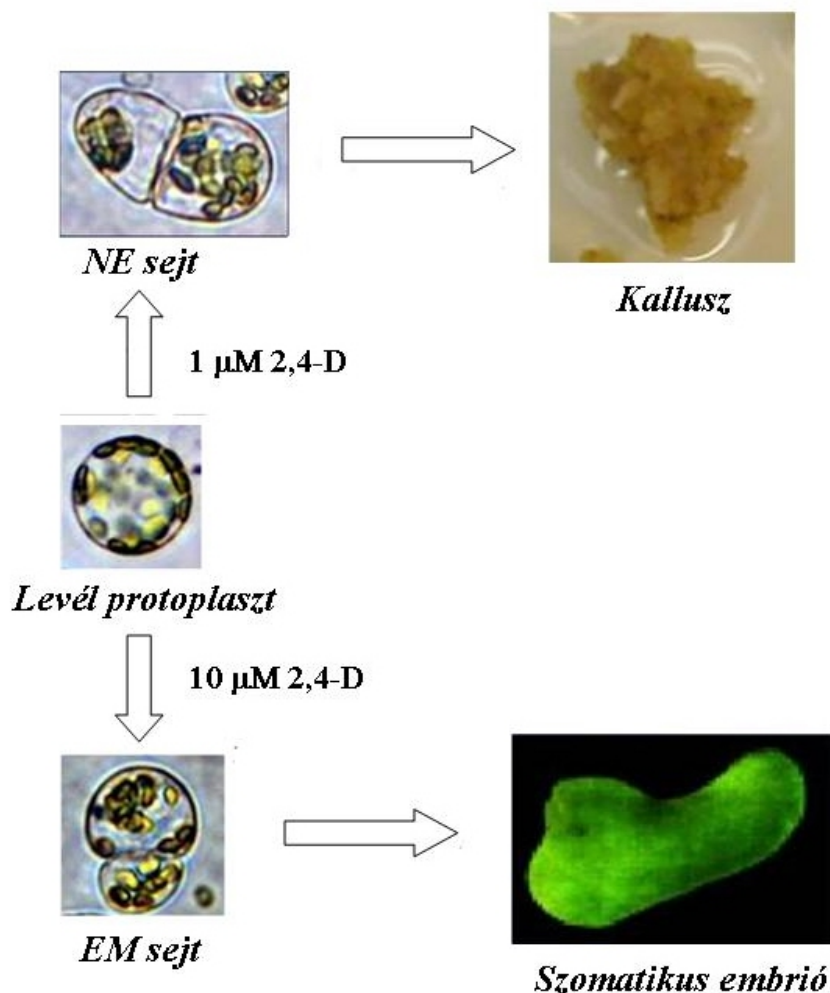
7. Eredmények

7.1. Az „embriogén” típusú sejtosztódás sajátosságai

7.1.1. A 2,4-D koncentráció hatása lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek fejlődésére

A kísérleteink során használt lucerna genotípus (*Medicago sativa* L. ssp. *varia*, A2 vonal) rendelkezik a szomatikus embriogenezis képességével, azaz testi sejtjeiből megfelelő 2,4-D koncentráció hatására nagy gyakorisággal szomatikus embriók fejlődése indítható el (Bögre és mtsai. 1990, Dudits és mtsai. 1991). A folyamat első lépései jól megfigyelhetők a levélprotoplaszt tenyésztési rendszerben. 10 μM 2,4-D jelenlétében nevelve a sejteket azok nem nyúlnak meg, hanem többé-kevésbé gömbalakúak maradnak, citoplazmájuk sűrű, és több kisebb vakuolumot tartalmaznak, osztódásuk az esetek többségében erősen asszimmetrikus (Bögre és mtsai. 1990; 5-1. Ábra). Ha a tápoldatban az auxin (2,4-D) tartalmát a tenyésztés 4-6-ik napját követően 0,36 μM indolecetsavra (IES) cseréljük, akkor a sejtek kompakt gömbalakú sejtkolóniákká („proembriók”) majd szomatikus embriókká (az embriófejlődés egymást követő stádiumai jól megfigyelhetők) fejlődnek, amelyekből teljes növények is felnevelhetők (7-1. Ábra). Ezekre a típusú sejtekre illetve sejttenyészetekre, egyedfejlődési potenciájuk alapján, a továbbiakban „embriogén” EM sejt-ként/tenyészet-ként hivatkozunk.

Kísérleti szempontból nagy előnye a rendszernek, hogy tízszer alacsonyabb, 1 μM 2,4-D koncentráció jelenlétében a sejtek teljesen más fejlődési utat követnek: jelentősen megnyúlnak, tiszta citoplazmával és nagy központi vakuolummal jellemezhetők. Többé-kevésbé szimmetrikus osztódásuk eredménye, az esetek többségében, két hasonló méretű és jellegű sejt, melyek tovább osztódva laza sejtkolóniákat hoznak létre, illetve a szomatikus embriófejlődés szempontjából optimális (0,36 μM IES a 4-6. naptól) körülmények között elpusztulnak. Ezt a sejt illetve tenyészet típust a továbbiakban „nem-embriogén” azaz NE sejt-ként/tenyészet-ként jelöljük.



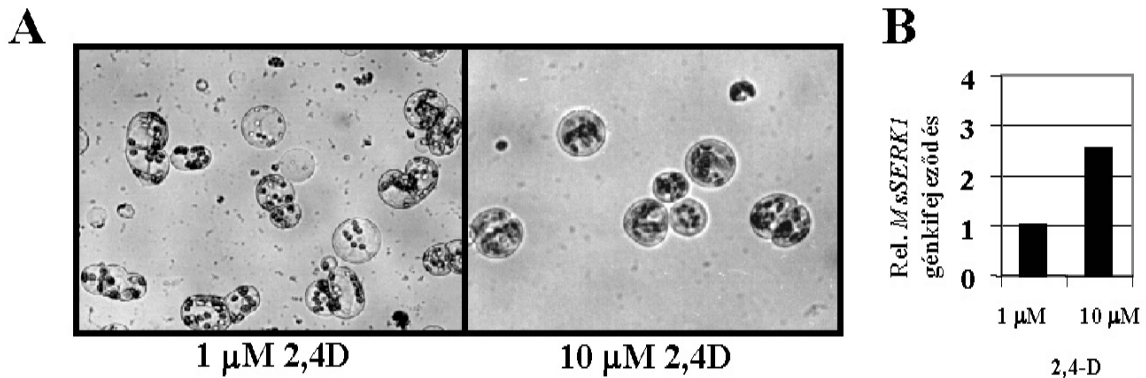
7-1. Ábra. *Lucerna* levélprotoplaszt eredetű sejtek alacsony ($1 \mu\text{M}$) és magas ($10 \mu\text{M}$) 2,4-D koncentráció mellett fejlődésének sematikus ábrázolása. EM – embriogén sejt/sejttenyészet; NE – nem-embriogén sejt/sejttenyészet

A lucerna levélprotoplaszt tenyésztési rendszer és a szomatikus embriogenezis indukció körülményeinek kidolgozása Bögre László munkája, akinek „Auxinindukált szomatikus embriogenezis tenyésztett lucerna sejtekben” (1989) c. kandidátusi értekezésében részletes magyarnyelvű leírás található.

Az alábbiakban ismertetett kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy mi a különbség az $1 \mu\text{M}$ és a $10 \mu\text{M}$ 2,4-D koncentrációnak a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekre gyakorolt hatásában, és ez milyen összefüggésben lehet a sejtek további fejlődésével és a szomatikus embriófejlődés egyedfejlődési programjának aktiválódásával.

7.1.2. A 10 μ M 2,4-D hatására nagyobb mértékben kifejeződött géntermékek azonosítása cDNS kivonáson alapuló módszerrel

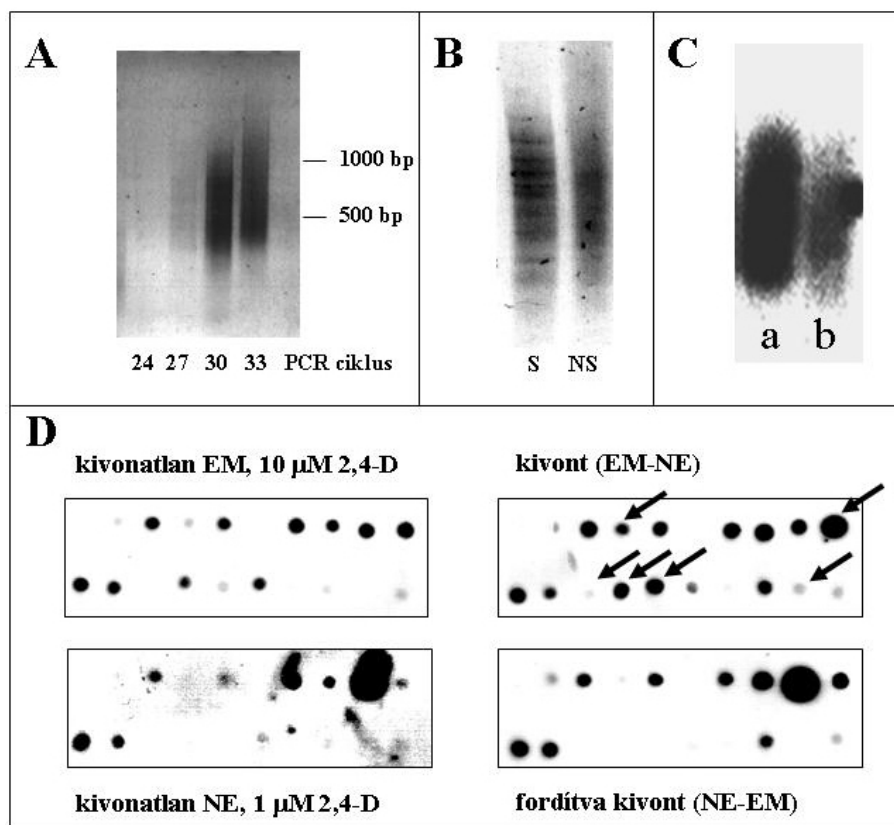
1 μ M és 10 μ M 2,4-D-vel kezelt lucerna (*Medicago sativa ssp. varia* A2) levélprotoplaszt eredetű sejt kultúrákból mRNS-t izoláltunk, majd azokat cDNS-sé írtuk át. Az 7-2/A Ábrán megfigyelhetők a két különböző 2,4-D koncentráció jelenlétében kialakuló morfológiai különbségek lucerna levélprotoplaszt sejtekben. A sejt morfológiai változásokon túl a sejtekben bizonyos gének kifejeződési mintázata is megváltozott a megnövekedett 2,4-D koncentráció hatására, melyet alátámaszt a kisméretű, kompakt sejtekben a szomatikus embriogenezis receptor kináz gén (MsSERK1, Nolan és mtsai. 2003) megemelkedett kifejeződése. (7-2/B Ábra). Annak érdekében, hogy további génkifejeződési különbségekre bukkanjunk az embriogén és kontroll sejtek között, valamint átfogó képet kapjunk a bennük zajló eltérő molekuláris folyamatokról, összehasonlítottuk génexpressziós mintázatukat.



7-2. Ábra: Az mRNS izoláláshoz és cDNS kivonáshoz használt sejtek jellemzői. A). A nem embriogén (1 μ M 2,4-D) illetve embriogén (10 μ M 2,4-D) körülmények között 4 napig tenyésztett lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek általános morfológiája B) A lucerna szomatikus embriogenezis receptor kináz (serk) gén relatív génkifejeződése az A) ábrarészen bemutatott kétféle tenyészetben. A génkifejeződést RT-QPCR-al határoztuk meg és egy aktin gén kifejeződési szintjére normalizáltuk.

Mivel teljes genom szintű génexpressziós vizsgálatra lucernában nem voltak meg a technikai feltételek és a rendelkezésre álló kísérleti minták mérete is korlátozott volt (kb. 2×10^5 sejt/minta), egy polimeráz láncreakció (PCR) alapú módszert választottunk a génkifejeződés összehasonlításra. Négynapos levélprotoplaszt eredetű sejtekből mRNS-t tisztítottunk, majd az mRNS molekulákat cDNS-sé konvertáltuk. Megfelelő módszerrel

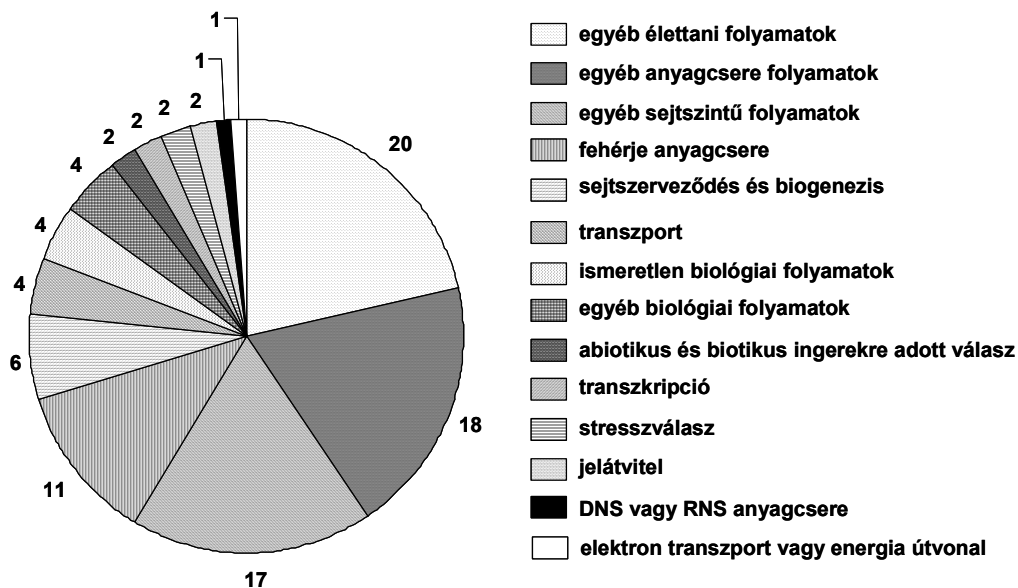
(PCR-alapú cDNS kivonás, „cDNA subtraction”) felszaporítottuk azokat a szekvenciákat, amelyek az egyik mintában nagyobb mennyiségben fordultak elő (7-3. Ábra).



7-3. Ábra. 10 illetve 1 μM 2,4-D jelenlétében 4 napig tenyésztett lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekből származó cDNS-ek „kivonása/szubtrakciója”. A) A mintegy 250 000 sejtől tisztított mRNS-ből származó cDNS exponenciális felszaporításához szükséges polimeráz láncreakció (PCR) ciklusszám meghatározása. B) Kivont (S) és kivonatlan (NS) cDNS összehasonlítása elektroforetikus elválasztást követően. A sávok megjelenése jelzi, hogy egyes cDNS molekulák feldúsultak a mintában. C) A B) ábra részen mutatott cDNS-ek molekuláris hibridizációja radioaktívan jelölt kivont (S) cDNS próbával. D) A kivont cDNS-ből készített cDNS könyvtárból származó egyedi cDNS fragmentumok molekuláris hibridizációja a feltüntetett radioaktívan jelölt cDNS mintákkal. A cDNS fragmentumokat négy ismétlésben, azonos elrendezésben, kötöttük a nylon membránra és párhuzamosan hibridizáltuk a négy próbával. A nyilak jelzik azokat a cDNS fragmentumokat, amelyek a „kivont” próbával specifikusan vagy erősebben hibridizálódnak. Ezek kerültek további jellemzésre.

A cDNS kivonást mindkét irányban elvégeztük: EM cDNS mint vizsgálandó („tester”) minta és NE cDNS mint kivonandó („driver”) minta (kivonás), és fordítva (fordított kivonás). Mivel a cDNS kivonás hatékonysága sohasem 100%, egy további cDNS szűrési lépést is beiktattunk. A kivonás eredményeként felszaporított cDNS darabokat bakteriális plazmid vektorba illesztettük (klónoztuk), így egy cDNS könyvtárt hoztunk létre. Ebből a cDNS könyvtárból ötszáz véletlenszerűen választott cDNS

inszeret hordozó plazmid molekulát megtisztítottunk és a DNS mintákat azonos elrendezésben négy nylon filterre csepegtettük, ún. DNS „makroarrayt” hoztunk létre. A négy, DNS mintákat tartalmazó, filtert különböző, radioaktívan megjelölt, cDNS mintával (kivont, fordítva kivont illetve kivonatlan EM és NE cDNS minták) DNS-DNS hibridizációval vizsgáltuk. A megfelelő hibridizációs mintázatot adó, az EM sejtekben az NE sejtekhez viszonyítva magasabb expressziós szintet mutató, 38 cDNS darabot megszekvenáltuk és szekvencia adatbázisokhoz hasonlítottuk. A kapott eredményeket a 7-1. Táblázat foglalja össze. A gén-nevezéktani kifejezések segítségével a szekvenciák funkcionális kategóriákba történő osztályozását a 7-4. Ábra szemlélteti.



7-4. Ábra. Az azonosított cDNS szekvenciák által kódolt fehérjék funkcionális kategóriákba történő osztályozása az *Arabidopsis* fehérjék szekvencia homológiája alapján (azok a cDNS klónok, melyek egyetlen *Arabidopsis* génnel sem mutattak homológiát, nem szerepelnek az ábrán) Az osztályozás a gén-nevezéktani kifejezések (gene ontology, GO) közötti automatikus keresésen alapszik, így egy fehérje több csoportba is sorolható (a különböző kategóriákba sorolt fehérjék száma az ábrán látható.)

Klón azonosító	Adatbázis azonosító	Homológ A. thaliana gén	Arabidopsis fehérje neve	Hasonlóság	Funkció
1_2	<u>AJ888478</u>	At3g22950	ARF jellegű fehérje	2.10E-64	MVT
1_5	<u>AJ888479</u>	Nincs találat	nincs	-	Nincs
1_11	<u>AJ888480</u>	At1g74560	lehetséges PP2A inhibitor (SET)	4.10E-18	NK
1_16	<u>AJ888481</u>	At2g28740	lehetséges hiszton H4 feh.	2.00E-36	NK
2_6	<u>AJ888482</u>	At5g45130	Ras-hoz köthető GTP-kötő RHA1 fehérje	1.90E-65	MVT
2_8	<u>AJ888483</u>	At1g07920	EF1 α elongációs faktor	5.20E-59	TR
2_11	<u>AJ888484</u>	At1g17180	2,4-D indukálható GST-S transzferáz jellegű	7.90E-34	S
2_14	<u>AJ888485</u>	At5g54160	0-metiltranszferáz	1.20E-41	SF
2_16	<u>AJ888486</u>	At1g17180	2,4-D indukálható GST-S transzferáz jellegű	4.30E-62	S
2_17	<u>AJ888487</u>	At5g02280	Ismeretlen fehérje	7.40E-12	H
2_19	<u>AJ888488</u>	At2g14835	Ismeretlen fehérje (zinc-finger fehérje)	2.20E-44	H
2_21	<u>AJ888489</u>	At4g11660	Hősokk transzkripció faktor	4.30E-30	S
2_23	<u>AJ888490</u>	At5g27700	S21 riboszomális fehérje	2.20E-35	TR
2_24	<u>AJ888491</u>	At2g41690	Hősokk transzkripció faktor	2.00E-16	S
3_4	<u>AJ888492</u>	Nincs találat	nincs	-	Nincs
3_10	<u>AJ888493</u>	At2g36170	CEP52 ubiquitin/ riboszomális fehérje	9.10E-32	TR
3_13	<u>AJ888494</u>	pir S47140, chickpea	Patogenezishez-köthető fehérje (PR10)	3.00E-38	S
3_14	<u>AJ888495</u>	At3g28780	hiszton-H4 fehérje	1.00E-26	NK
3_15	<u>AJ888496</u>	At1g27310	2. magi transzport faktorról azonos	2.40E-52	NK
3_16	<u>AJ888497</u>	Nincs találat	WD-ismétlődés?	-	H
3_17	<u>AJ888498</u>	At2g35930	Ismeretlen fehérje	3.10E-29	H
3_19	<u>AJ888499</u>	At1g63810	Feltételezett fehérje	3.90E-49	H
3_20	<u>AJ888500</u>	At5g19510	EF1 β elongációs faktor	1.90E-59	TR
4_1	<u>AJ888501</u>	At4g19860	Ismeretlen fehérje	4.40E-40	H
4_3	<u>AJ888502</u>	Nincs találat	HR-kapcsolt Ca-kötő feh.-szerű	-	S
4_13	<u>AJ888503</u>	At3g19540	Ismeretlen fehérje	1.20E-14	H
4_21	<u>AJ888504</u>	At3g12580	Lehetséges fehérje (Hsp70)	8.30E-91	S
5_2	<u>AJ888505</u>	At2g37770	aldo/keto-reduktáz	1.30E-62	S
5_3	<u>AJ888506</u>	At4g02080	SAR1 GTP-kötő szekréciós faktor	1.10E-54	MVT
5_4	<u>AJ888507</u>	At5g53880	Ismeretlen fehérje	0.75	H
5_5	<u>AJ888508</u>	At1g78340	GST7 fehérje	1.40E-59	S
5_6	<u>AJ888509</u>	Nincs találat	nincs	-	nincs
5_12	<u>AJ888510</u>	At2g44790	fitocianin, kék Cu-kötő fehérje II	1.80E-15	S
5_14	<u>AJ888511</u>	At3g11510	40S riboszomális fehérje s14	0.0052	TR
5_15	<u>AJ888512</u>	At4g09320	Nukleozid-difoszfát kináz	2.90E-24	M
5_16	<u>AM292925</u>	At5G06260	Ismeretlen fehérje (oxr1)	2.00E-71	S
5_17	<u>AM292926</u>	At3g04840	40S riboszomális fehérje S3A	4.00E-32	TR
5_20	<u>AJ888513</u>	Nincs találat	nincs	-	nincs

7-1. Táblázat. Az azonosított 38 cDNS szekvencia hasonlósága *Arabidopsis thaliana* L. cDNS-ekhez és a kódolt fehérjék feltételezett biológiai funkciója. H-hipotetikus fehérje; M-anyagcsere; MVT-membrán illetve vezikulum transzport; NK-sejtmag/kromatin; Nincs-nem ismert hasonló fehérje; S-stressz; SF- sejtfal; TR-transzláció

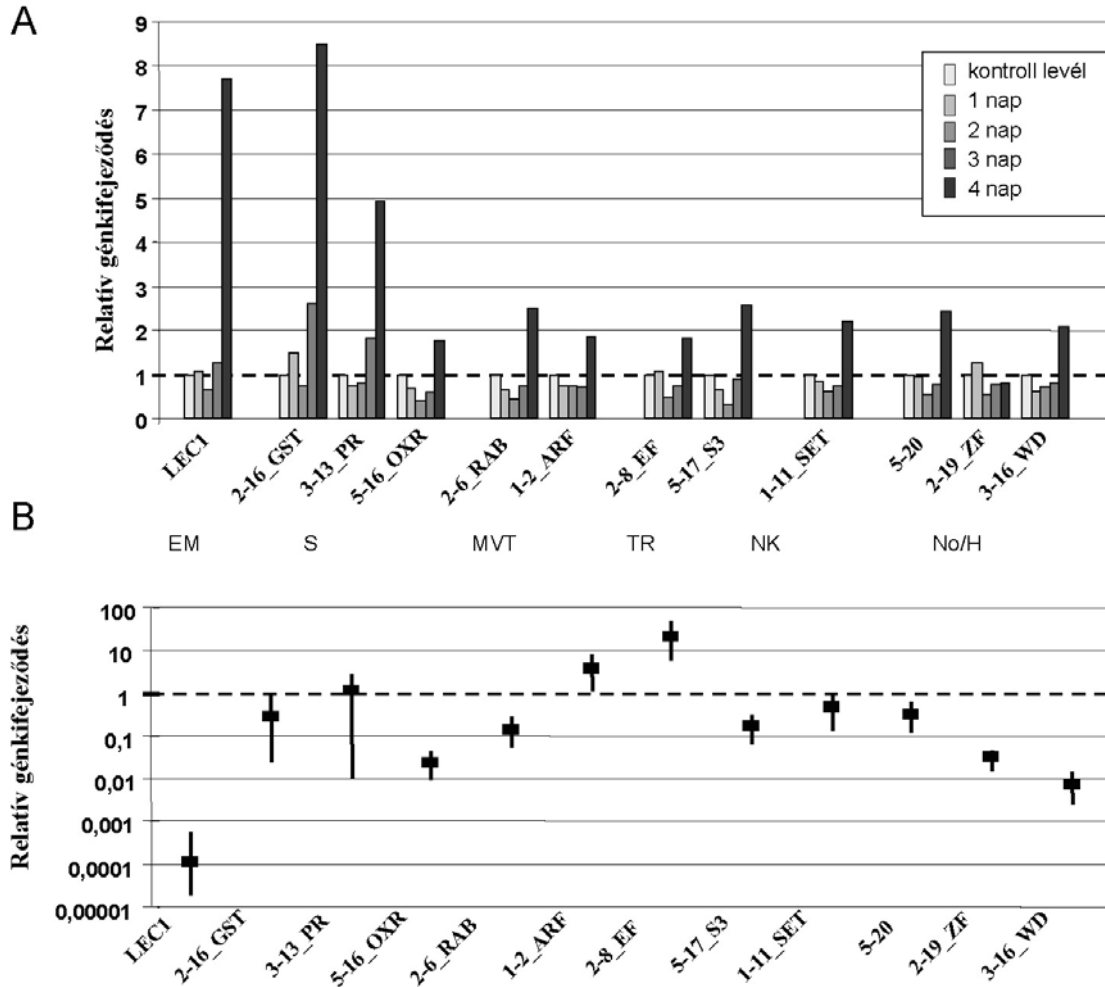
7.1.3. A génexpresszió 2,4-D indukálhatósága

Az azonosított gének kifejeződésének a szomatikus embriogenezissel való kapcsolatát további génexpressziós vizsgálatokkal kíséreltük meg tisztázni. A 38 gén közül 11 különböző funkcionális kategóriába sorolható fehérjét kódoló gént választottunk ki a részletesebb vizsgálatokhoz (stresszhez-köthető: GST-transzferáz jellegű 2-16_GST, patogenezishez köthető fehérje PR10-szerű 3-13_PR, oxidatív stressz-rezisztencia fehérje-szerű 5-16_OXR; intracelluláris transzportozhoz köthető: kis GTPázok 2-6_RAB, 1-2_ARF; transzlációhoz köthető: α elongációs faktor 2-8_EF, 40S riboszomális fehérje 5-17_S3; transzkripcióhoz/kromatinhoz köthető: nukleoszóma-kapcsolt fehérje szerű foszfatáz inhibitor 1-11_SET; feltételezett fehérjék: 5-20, 2-19_ZF, 3-16_WD).

A génkifejeződés 2,4-D koncentráció függését lucerna (*M. sativa ssp. varia* A2) leveleken vizsgáltuk: a fiatal leveleket 1 és 10 μ M 2,4-D tartalmú folyadék tápközegben úsztattuk négy napig. A negyedik napon vizsgálva a 2,4-D képes volt sejtosztódást indukálni a levelekben. Így tehát a 2,4-D génkifejeződésre gyakorolt hatása jól elkülöníthetővé vált azoktól a génexpressziós változásoktól, melyek a szomatikus embriogenezis folyamatával állnak összefüggésben. Ezenfelül a protoplasztálás lépésének kihagyásával csökkent a sejteket érintő stressz mértéke (hiszen nem volt jelen gombaeredetű enzim-készítmény, nem történt sejtfaleméztés és azt követő szintézis, nem játszódtott le erős ozmotikus stressz), mely pontosabb 2,4-D hatásanalízist tett lehetővé.

A levelekből naponta mintát vettünk, amelyből RNS-t tisztítottunk, cDNS-t szintetizáltunk, majd cDNS-specifikus oligonukleotidok felhasználásával valós idejű („real-time”) PCR reakcióban meghatároztuk a cDNS-ek által reprezentált gének relatív kifejeződését a két 2,4-D koncentráció mellett (7-5/A Ábra). Kontrollként, az embriogén egyedfejlődésben szerepet játszó *mslec1* gén expresszióját is megvizsgáltuk, s az eredményeket egy aktin gén kifejeződésére normalizáltuk. Egy gén (2-19_ZF) kivételével minden gén magasabb relatív kifejeződést mutatott a negyedik napon a 10 μ M 2,4-D hatására, ideértve a kontroll *mslec1* gént is. Ez utóbbi több, mint hétszer nagyobb kifejeződést mutatott, de hangsúlyoznunk kell, hogy a LEC1 gén expressziója rendkívül alacsony a többi vizsgált génhez képest. Jól látható az 7-5/B. Ábrán, hogy a LEC1 és a másik 11 –számunkra érdekelt- vizsgált gén relatív génkifejeződési szintje között három

nagyságrendnyi különbség mutatkozik. 8 gén a kontroll aktin gén kifejeződésével összevethető erősségű (egy nagyságrenden belüli) génkifejeződési szintet mutatott, mely tehát erős génexpresszióra utal.



7-5. Ábra. Relatív génkifejeződés négy napig 10 μ M 2,4-D-vel kezelt lucerna levelekben az 1 μ M 2,4-D-vel kezelt levelekhez viszonyítva. A) A 11 azonosított gén, valamint az embriogén marker LEC1 kontrol gén relatív génkifejeződése. A vizsgált géneket feltételezett funkciójuk szerint csoportosítottuk (S-stressz; MVT-membrán illetve vezikulum transzport; NK-sejtmag/kromatin; SF-sejtfal; TR-transzláció; No/H- nem ismert vagy hipotetikus fehérje) B) A vizsgált gének kifejeződési tartománya és átlaga az aktin gén kifejeződési szintjére normalizálva (szaggatott vonal). A relatív génkifejeződést RT-QPCR-ral vizsgáltuk az 1. táblázatban felsorolt primerek segítségével. Minden génkifejeződést egy aktin gén kifejeződésére normalizáltunk.

7.1.4. Génkifejeződés a szomatikus embriogenezis korai és kései szakaszában

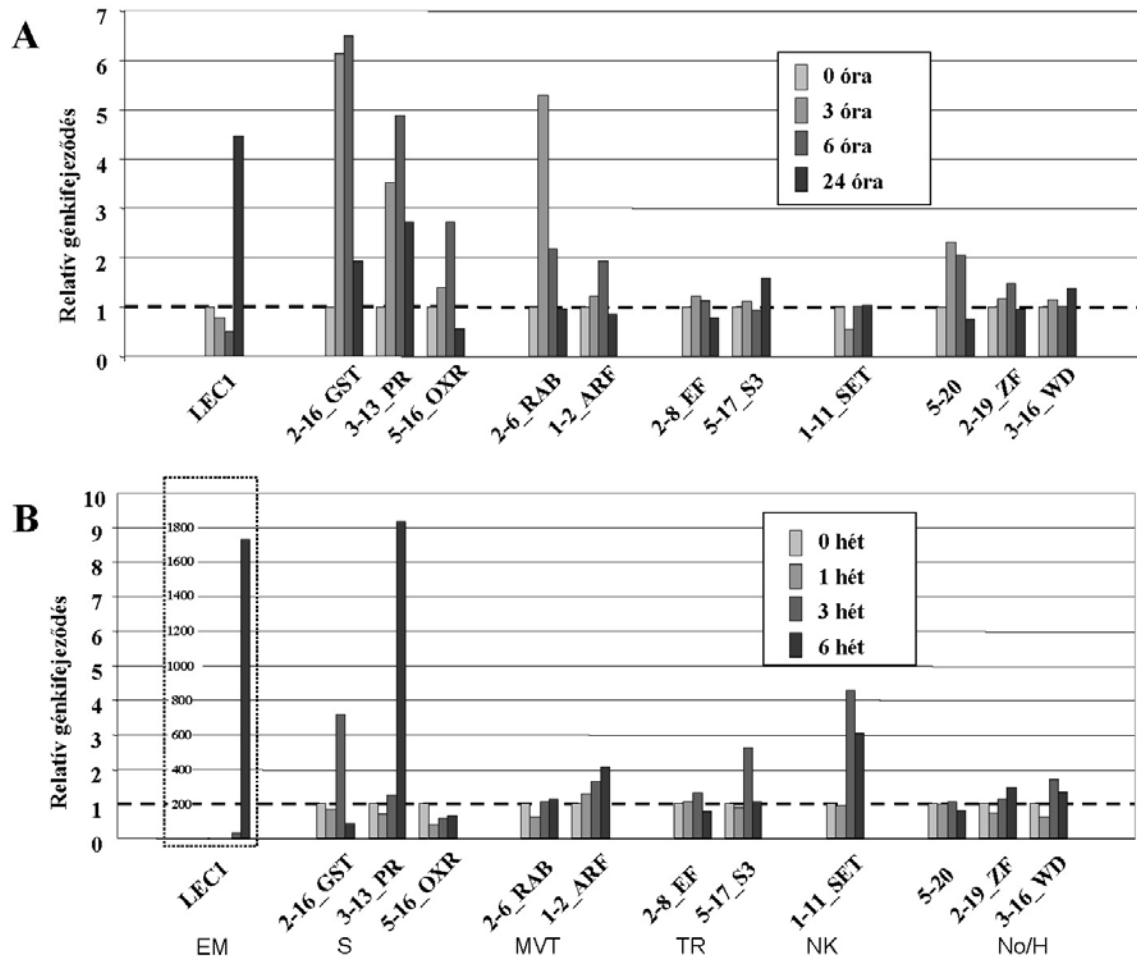
Hogy magyarázatot találjunk a gének kifejeződése és a szomatikus embriogenezis közötti lehetséges kapcsolatra, egy másik kidolgozott kísérleti rendszert is megvizsgáltunk. Ebben a rendszerben naftilecetsav (NES) jelenlétében tenyésztett lucerna (*Medicago sativa ssp. sativa* cv. Rambler) sejtek (ún. mikrokalluszok) kerültek kezelésre 100 μ M 2,4-D-vel egy óráig (Györgyey és mtsai. 1991, 1997).

A rövid kezelést követően a mikrokalluszokat hormonmentes tápközeggel történő alapos átmosás után ugyancsak hormonmentes tápoldatban tenyésztették tovább. Ezek között a körülmények között a mikrokalluszok felületén szomatikus embriók jelentek meg a kezelést követő 3-4. héten, majd a hatodik hétre a tenyészeteket már a szomatikus embriók nagy tömege jellemezte (Györgyey és mtsai. 1997). Kontroll tenyészetekben, melyekben a magas 2,4-D koncentrációval való kezelés elmaradt, szomatikus embriók nem fejlődtek, ezzel szemben a hatodik hétre a mikrokalluszokon gyökér differenciálódás volt megfigyelhető (Dudits és mtsai. 1991, Györgyey és mtsai. 1997). Ebben a kísérleti rendszerben, mind a 2,4-D kezelt, mind a kezeletlen tenyészetekből vettünk mintákat, a kezelést követő korai (3, 6, 24 óra), a 2,4-D hatást tükröző, és késői (1,3,6 hét), az embriófejlődést lefedő, időpontokban. A vizsgált gének relatív génkifejeződését, a kezelt és kezeletlen mintákat összevetve, az 7-6. Ábra mutatja.

Megállapítható, hogy a korai szakaszban, a rövid, de igen magas 2,4-D koncentráció hatására a stresszel (2-16_GST, 3-13_PR, 5-16_OXR) és a membrán/vezikulum transzporttal (1-2_ARF, 2-6_RAB) kapcsolatba hozható vizsgált gének, valamint az 5_20 jelű, ismeretlen fehérjét kódoló gén relatív kifejeződése (kb. kétszeresére) megnőtt. Ez a növekedés a korábbi időpontokban (3-6 óra) nagyobb, majd a auxinmentes körülmények között, a gének többségénél, fokozatosan csökken, vagy alig változik egy hétig. A harmadik héttől kezdődően, a szomatikus embriók megjelenésével és fejlődésével párhuzamosan, néhány gén relatív expressziója ismét megemelkedik. Ide tartozik két stresszel kapcsolatos fehérjét kódoló gén (GST-transzferáz illetve patogenezis kapcsolt fehérje), egy vezikulum transzportban szerepet játszó fehérje génje (ARF-típusú

GTPáz), egy riboszómális fehérjét kódoló gén (S3a), és a SET foszfatáz inhibitor fehérjét kódoló gén.

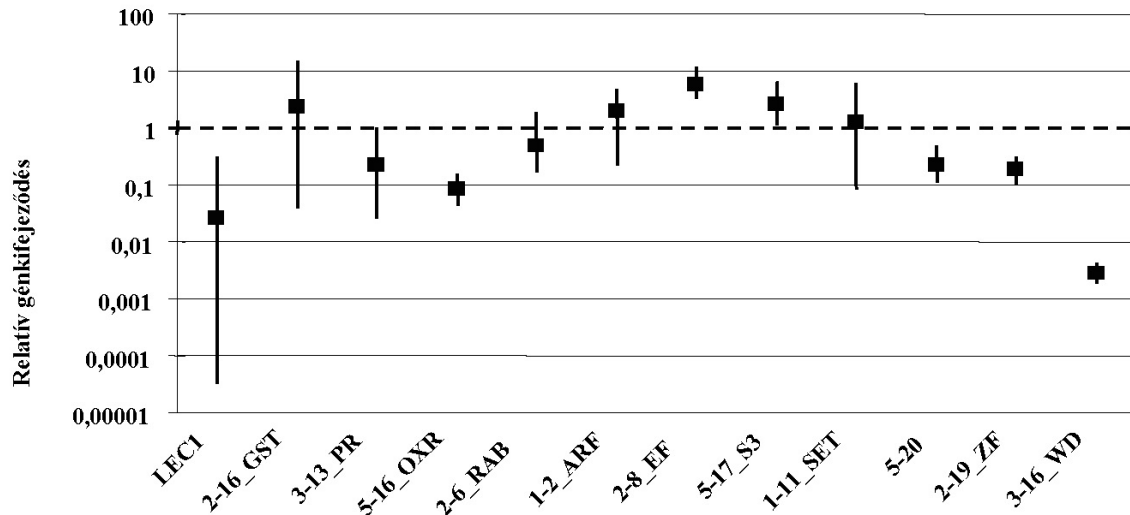
A kontrol *mslec1* relatív génkifejeződése, a kezelést követő csökkenés után, a 24. órától fokozatosan emelkedik, a harmadik hétre 30-szoros, a hatodik hétre több mint 1600-szoros a génkifejeződési különbség az összehasonlított mintákban.



7-6. Ábra. Relatív génkifejeződés $100 \mu\text{M}$ 2,4-D-vel egy óra hosszágig kezelt, majd auxinmentes tápoldatban tenyésztett mikrokallusz sejtekben, a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A) Korai génkifejeződés (első nap) B) kései génkifejeződés (1-6 hét). A génkifejeződést egy aktin gén kifejeződésére normalizáltuk. A vizsgált géneket feltételezett funkciójuk szerint csoportosítottuk (EM-embriogenezis (kontroll); S-stressz; MVT-membrán illetve vezikulum transzport; NK-sejtmag/kromatin; SF-sejtfal; TR-transzláció; No/H- nem ismert vagy hipotetikus fehérje). A *lec1* gén igen magas relatív kifejeződését egyedi skálán ábrázoltuk.

Ebben a kísérleti rendszerben egy kivétellel (3-16_WD) az összes vizsgált gén relatív génkifejeződési szintje hasonló az aktin gén expressziós szintjéhez (7-7. Ábra), ami magas szintű kifejeződésre utal a tenyésztett sejtekben. Bár az *MsLEC1* gén relatív

génkifejeződési szintje négy nagyságrendnyit is emelkedett a kísérlet során, még így sem tudta elérni az aktin gén kifejeződési szintjét.



7-7. Ábra. A vizsgált gének kifejeződési tartománya és átlaga az aktin gén kifejeződési szintjére normalizálva (szaggatott vonal) a 100 μ M 2,4-D-vel egy óra hosszágig kezelt, majd auxinmentes tápoldatban tenyésztett, mikrokallusz sejtekben.. A relatív génkifejeződést RT-QPCR-al vizsgáltuk az 1. táblázatban felsorolt primerek segítségével. Minden génkifejeződést egy aktin gén kifejeződésére normalizáltunk.

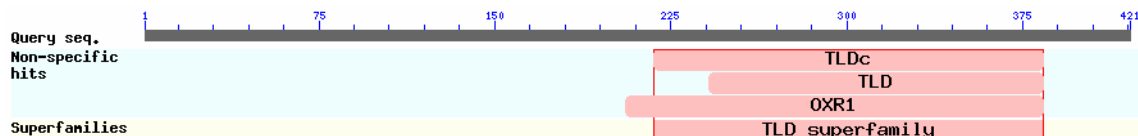
A vizsgált gének változatos relatív génexpressziós mintázatot mutattak a használt kísérleti rendszerekben, ami arra utal, hogy változatos szerepet töltenek be az EM sejtekben. Részt vehetnek a 2,4-D-re, mint auxinra, illetve mint stressz faktorra adott válaszbán, de kapcsolódhatnak az embriófejlődés aktiválódását kísérő átfogó celluláris változásokhoz is.

7.2. Az Oxprot gén illetve fehérje jellemzése

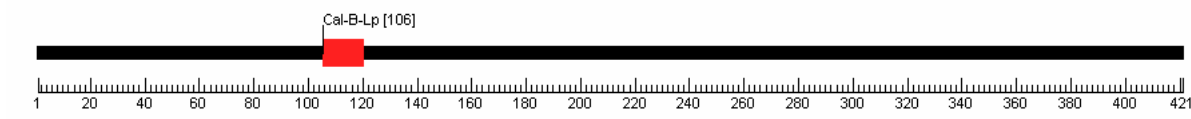
A lucerna (*M. sativa ssp. varia* A2) levélprotoplaszt eredetű sejtek szomatikus embriogenezisben részt vevő génjeinek azonosítását követően a gének közül a feltételezett funkció és az expressziós mintázat alapján kiválasztottunk egy gyakorlati szempontból is ígéretesnek ítélt lucerna cDNS-t, melyet eddig az 5_16-os számmal jelöltünk. Ez a gén homológiát mutatott az oxidatív stresszrezisztenciában szerepet kapó OXR1 (oxidation resistance 1) emberi génnel (Volkert és mtsai. 2000), mely egy csak az eukariótákban jelenlévő konzervált géncsalád tagja. Az 5_16-os részleges cDNS-t próbaként használva a teljes hosszúságú cDNS-t egy *Medicago sativa ssp. varia* A2 levélprotoplasztokból készült cDNS-könyvtárból sikerült azonosítani. Így az oxidatív stresszrezisztenciában feltételezetten szerepet kapó *Medicago sativa* gént MsOxprotnak neveztük el.

Az MsOxprot fehérjének élesztőben, muslicában, emberben, lúdfüben és még nagyon sok szervezetben megtalálhatóak a homológjai, mely valóban egy evolúciósan konzervált szerepre utalhat. Az aminosav sorrendek összehasonlítását az 7-8. Ábra mutatja be.

A génről átíródott fehérje 421 aminosavból áll, és becsült mérete 47.15 kDa. A fehérje C-terminális részén tartalmaz egy konzervált domént, mely a TLD domén szuperfamília tagja. Ezen domének funkciója eddig ismeretlen, de feltételezik, hogy enzimatis aktivitással rendelkezhet. Ebbe a domén családba sorolták az emberi OXR1 fehérje oxidatív reszisztenciájáért felelős doménjét is.

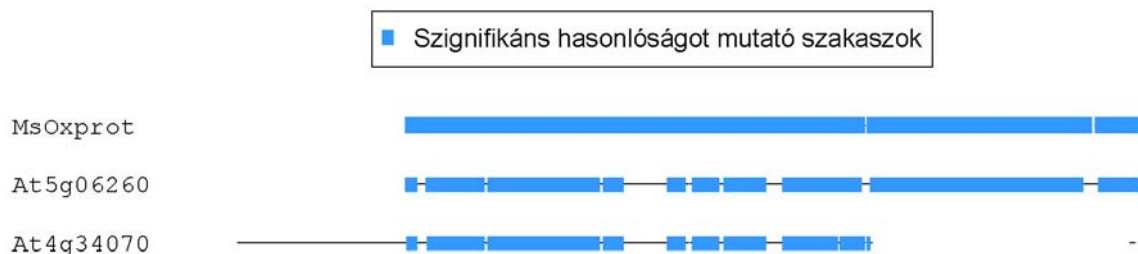


A fehérjén még található egy kalcium-kötő EF-hand motívum,



Mivel az *Arabidopsis thaliana*, magyarul lúdfű a növényi genetikai kutatások egyik modell organizmusa, s esetében lehetséges mind funkció-vesztéssel járó mutáns, mind fehérje túltermelő transzformáns növényekre szert tenni, ezért kiterjesztettük kutatásainkat az MsOxprot lúdfű homológjaira is.

Arabidopsisban két, az MsOxprottal 63- és 29%-os hasonlóságot mutató fehérjét találtunk, melyeket az At5g06260 és At4g34070-es gének kódolnak. (7-9.Ábra)



7-9. Ábra: Az MsOxprot fehérje lúdfű homológokkal mutatott hasonlóságának sematikus ábrája.

A két lúdfű gén szekvenciájának összehasonlításánál azonban kiderült, hogy csak az At5g06260 gén tartalmazza a teljes TLD domént (7-10. Ábra), mely feltehetően felelős az oxidatív stresszrezisztencia kialakításáért. Az At4g34070 gén által kódolt fehérje bár hasonló méretű, azonban elől hosszabb, hátul pedig rövidebb a másik fehérjéhez képest, és csak részleges TLD domént tartalmaz. Ezért csak a teljes domén szekvenciáját tartalmazó homológgal kezdtünk dolgozni, melyet elneveztünk AtOxprotnak.



7-10. Ábra. Az MsOxprot fehérje Arabidopsis homológjainak szerkezeti hasonlóságát bemutató sematikus ábra

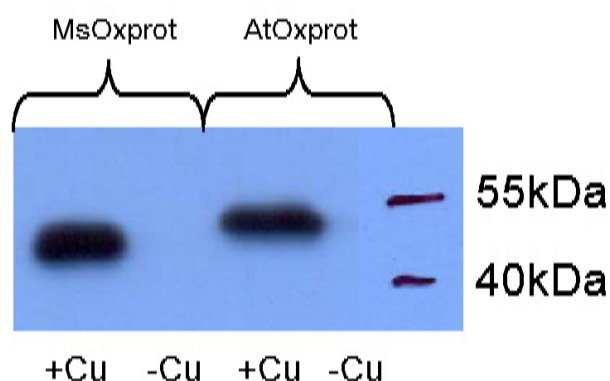
Az At5g06260 gén által kódolt AtOxprot fehérje 424 aminosavból áll, s becslő mérete 47.4 kDa. Az MsOxprothoz hasonlóan tartalmaz egy kalcium-kötő EF-hand helyet, a teljes TLD domént, valamint szintén mitokondriális, vagy kloroplasztisz

lokalizáció valószínűsíthető számára a TargetP 1.1 Server prediktáló program segítségével (13-2. Ábra a függelékben).

7.2.1. A lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék képesek komplementálni az *oxr1*_ mutáns élesztő törzs hidrogén-peroxid érzékenységét.

Egy korábbi tanulmány szerint az *oxr1*_ mutáns élesztő törzs kb. tízszerre érzékenyebb hidrogén-peroxid kezelésre, mint a vad típusú törzs (Volkert és mtsai, 2000). Annak érdekében, hogy megállapítsuk vajon a lucerna és lúdfű Oxprot képes-e komplementálni az *oxr1*_ mutáns élesztő törzset, az At- és MsOXPROT fehérjéket réz-indukálható promóter segítségével fejeztettük ki mutáns háttérben, majd vizsgáltuk azok hidrogén-peroxid rezisztenciáját.

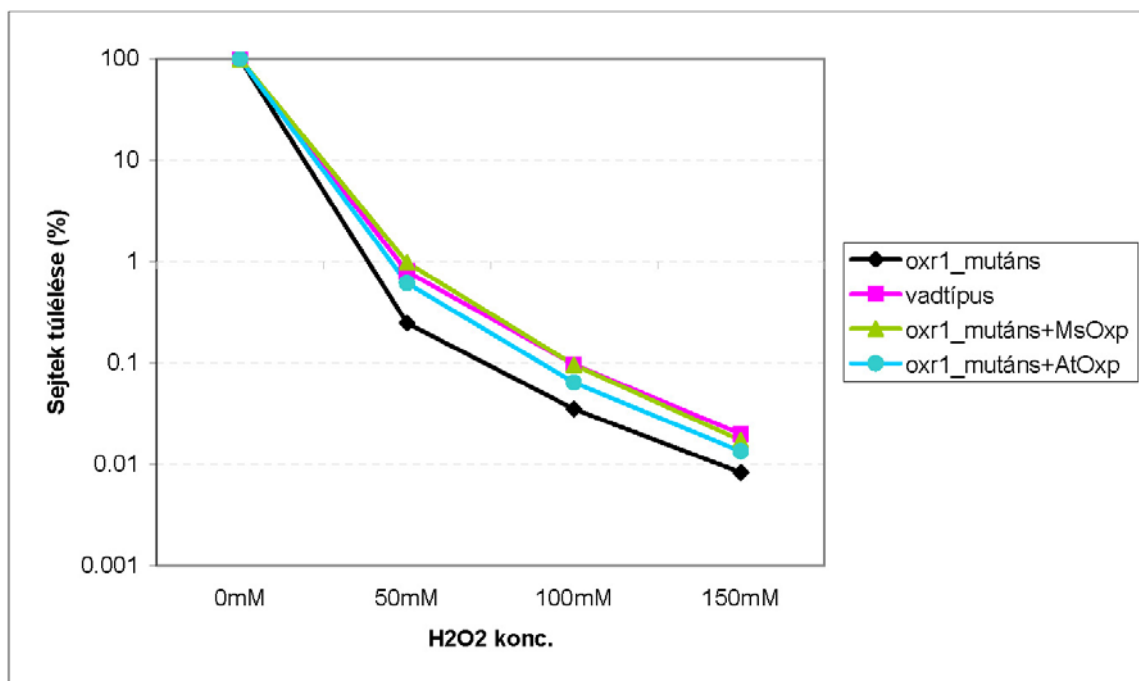
A kísérlet során a réz jelenléte mellett növesztett élesztő törzseket egy órán keresztül különböző koncentrációjú H_2O_2 (50, 100, 150 mM) kezelésnek tettük ki, majd megfelelő hígításban, szintén réz tartalmú lemezekre szélesztettük. A rézindukciót a hidrogén-peroxid kezelés előtt mintegy 10 órával kezdtük meg a növesztő tápoldathoz történő $10\mu M$ $CuSO_4$ hozzáadásával, s az indukció meglétét az affinitás tisztított MsOxprot-ellenanyaggal ellenőriztük Western-blot analízisen (7-11. Ábra).



7-11. Ábra. Az *oxr1*_ mutáns élesztő törzsben Cu-indukálható promóter segítségével kifejeztetett MsOxprot és AtOxprot fehérjék jele Western-blot analízisen. +Cu = $10\mu M$ $CuSO_4$ a tápközegekben, mellette a kontrol minta.

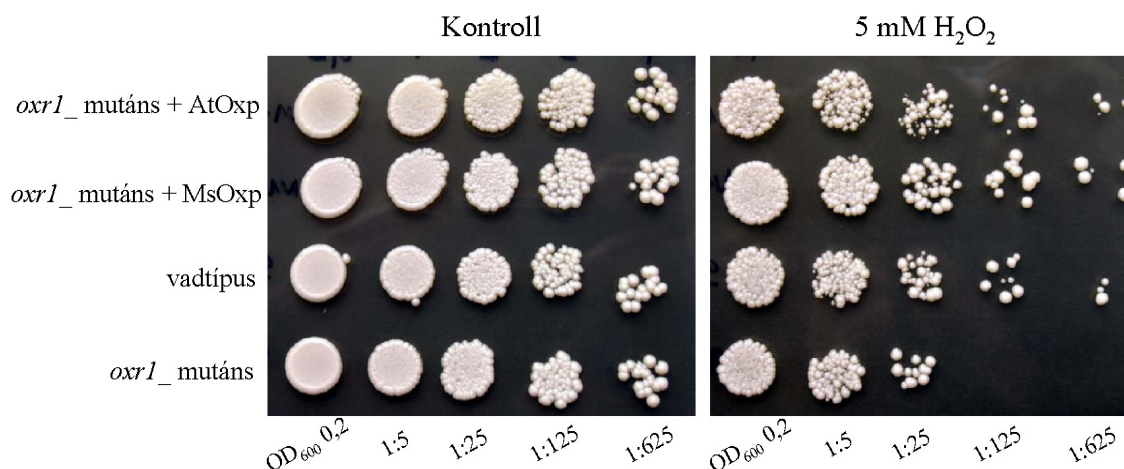
A három nap múltán felnőtt telepeket leszámoltuk, s az eredményekből túlélési görbét készítettünk (7-12. Ábra). Az MsOXPROT-ot expresszáló törzs szinte tökéletesen

a vad típusú törzs ellenállási szintjét mutatta a hidrogén-peroxid kezelés után, az AtOXPROT-ot kifejező pedig valamivel e szint alatt maradt, de még így is sokkal jobbnak mutatkozott a mutáns törzshöz képest. Mindez arra utal, hogy a lucerna és lúdfű OXPROT fehérje képes a mutáns törzset megvédeni az oxidatív károsodással szemben, s annak hidrogén-peroxid érzékenységét visszaállítani közel a vad típusú törzs szintjére.



7-12. Ábra. A különböző koncentrációjú H_2O_2 -nak 1 órán keresztül kitett vad típusú, *oxr1*_mutáns, valamint az MsOXPROT, illetve AtOXPROT fehérjével komplementált *oxr1*_mutáns élesztők százalékos túlélési görbéje. A kísérlet során használt H_2O_2 koncentrációk: 50 mM, 100 mM, 150 mM; At Y tengely logaritmikus skálát ábrázol.

Egy másik kísérletben a mutáns és vad típusú élesztő törzseket többféle koncentrációjú (1-7 mM) H_2O_2 -t tartalmazó táptalajra cseppentettük ki különböző hígításokban, és figyeltük, hogy a telepek számában látható-e különbség (Demasi és mtsai. 2006). Az 5 mM H_2O_2 -t tartalmazó táptalajon az *oxr1*_mutáns és vad típusú élesztő között éles különbség volt felfedezhető, így ilyen körülmények között elvégeztük a komplementációs kísérletet. A rézindukált élesztő törzseket 600 nm-en mért 0.2 OD-re hígítottuk, majd azokból 1:5, 1:25, 1:125, 1:625-ös hígításokban 12 μ l-es cseppeket helyeztünk a rézsulfátot és 5 mM H_2O_2 -t tartalmazó táptalajra (7-13. Ábra).



7-13. Ábra. A vadtípusú, *oxr1*_mutáns, valamint az *MsOxprot*, illetve *AtOxprot* fehérjével komplementált *oxr1*_mutáns élesztők növekedése 5mM H₂O₂-dal kiegészített táptalajon 4 nap után. Az első oszlopban 12 µl-nyi 600nm-en mért 0,2 OD-re hígított élesztőt cseppentettünk ki a különböző törzsekből, s a többi oszlopban azok 1:5, 1:25, 1:125, 1:625-ös hígítási sorozata látható.

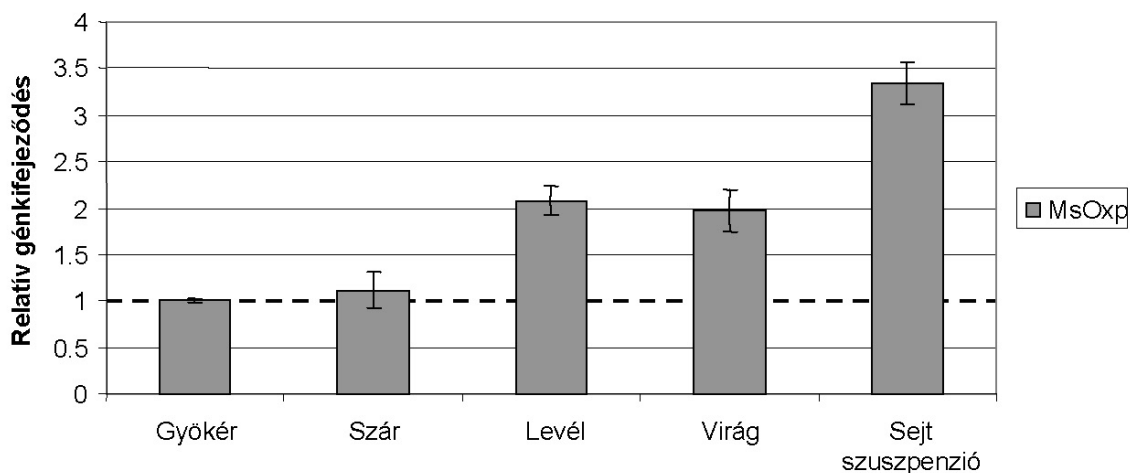
Az AtOXPROT-ot és MsOXPROT-ot kifejező *oxr1*_mutáns élesztő törzsek a vadtípusú törzshöz hasonló túlélést mutattak adott körülmények között, vagyis ez a kísérlet is alátámasztotta, hogy az adott fehérjék képesek visszaállítani a mutáns törzs hidrogén-peroxid érzékenységét a vadtípusú törzs szintjére.

7.2.2. Génkifejeződési vizsgálatok

7.2.2.1. Szervspecifikus génkifejeződés vizsgálata

7.2.2.1.1. *MsOxprot* szervspecifikus génkifejeződése

Az élesztő kísérletet követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a lucerna (*Medicago truncatula*) *MsOxprot* szervspecifikusan fejeződik-e ki. Ezért valós idejű PCR segítségével négy növényi szervben, valamint egy sejtszuspenzióból származó mintában megvizsgáltuk a gén relatív kifejeződési szintjét a gyökérben mért kifejeződési szintet véve alapul. Az eredményeket a 7-14. Ábra szemlélteti.



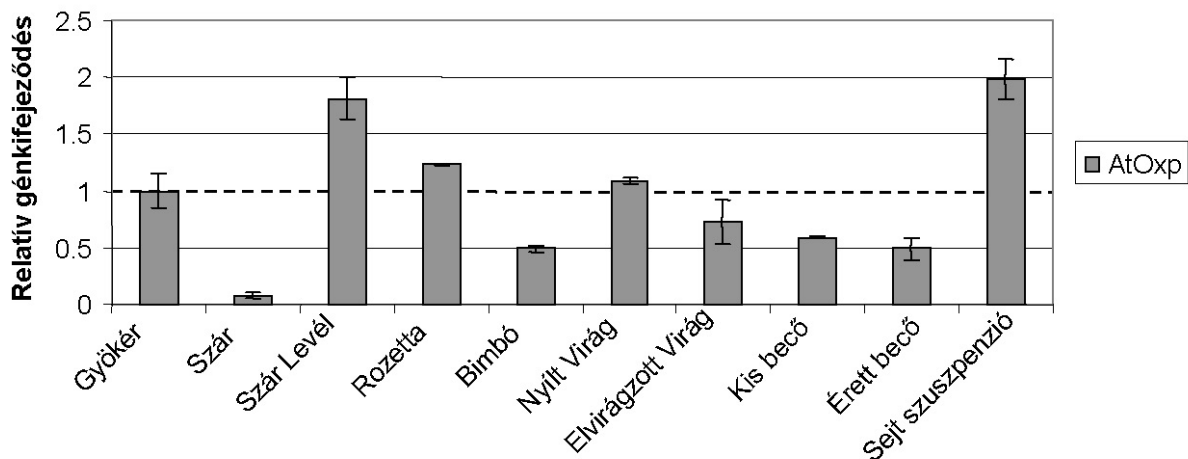
7-14. Ábra. A lucerna MsOxprot gén relatív génkifejeződése különböző növényi szervekben és sejtszuszpénzióban. A génkifejeződést egy lucerna aktin gén kifejeződésére normalizáltuk.

A kísérlet eredményeképpen megállapítható, hogy az MsOxprot gén minden vizsgált szervben kifejeződik, valamint a levélben és virágban mérhető géntermékszint mintegy kétszerese, a sejtszuszpénzióban pedig mintegy háromszorosa a gyökérben mérhetőnek.

7.2.2.1.2. AtOxprot szervspecifikus génkifejeződése

Az AtOxprot esetében is megvizsgáltuk a gén relatív kifejeződését különböző növényi szervekben, valamint sejtszuszpénzióban a gyökérben mért kifejeződési szintet véve alapul (7-15.Ábra).

Megállapítható, hogy a gén kifejeződési szintje a gyökérhez hasonlóan a levelekben, virágban és a sejtszuszpénzióban a legmagasabb, a termésekben ezekhez képest már alacsonyabb, s a szárban csak tizedannyi a géntermék mennyisége, mint a gyökérben. Így további vizsgálatainkat zöld növényi leveleken és sejtszuszpénzióon végeztük.

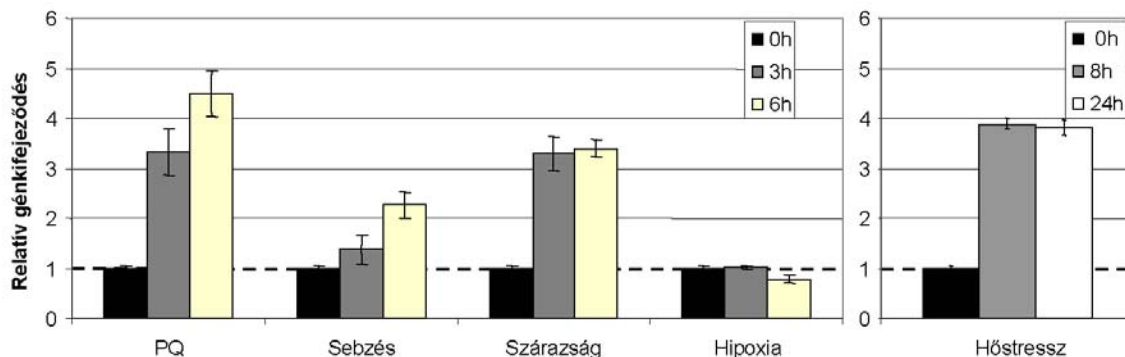


7-15. Ábra. Az *Arabidopsis* *AtOxp* prot gén relatív génkifejeződése különböző növényi szervekben és sejtuszuspenzióban. A génkifejeződést a glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz (GAPDH2) gén kifejeződésére normalizáltuk.

7.2.2.2. Stresszkörülmények alatti génkifejeződés vizsgálata

7.2.2.2.1. *MsOxp* prot gén stresszkörülmények alatti vizsgálata

Fiatal lucerna növények leveleit 3 és 6 órára paraquat, sebzés, valamint kiszáradásos stresszkezelésnek tettük ki, kíváncsian arra, hogy az adott körülmények indukálják-e a gén kifejeződését. Emellett lucerna sejtuszuspenzió (*Medicago sativa* ssp. *varia* A2) hipoxia kezelést végeztünk, az előző stresszkezelésekhez hasonló időpontokban véve mintát. Steril körülmények között növekedő fiatal növényeken pedig 37°C-os hőstresszt alkalmaztunk, melyből 8 és 24 óra elteltével történt mintavételezés. A kapott eredményeket a 7-16. Ábra szemlélteti.

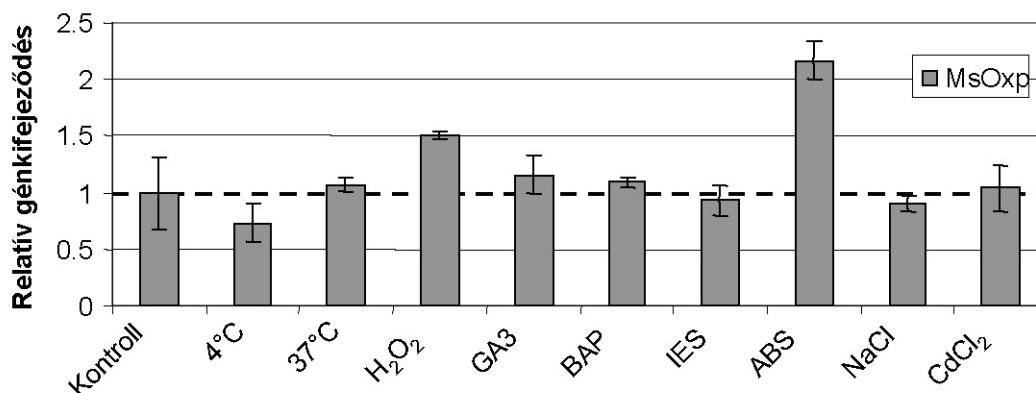


7-16. Ábra. A lucerna MsOxprot gén relatív génkifejeződése különböző stresszkezeléseknek kitett fiatal leveleken és sejtszuszpenzió. A génkifejeződést egy lucerna aktin gén kifejeződésére normalizáltuk. Kezelések: 10 μ M paraquat (levágott levelek paraquat tartalmú vízzel átitatott szűrőpapíron), sebzés (vízes szűrőpapíron fekvő levelek borotvapengével többször megvágva), szárazság (levágott levél nyitott petricsészében hagyva szobahőmérsékleten), hipoxia (sejtszuszpenzió közel légmentesen lezárva és himbálva), 37°C hőstressz (steril növény zárt konténerben termosztátba helyezve).

Az alkalmazott stresszkezelések a hipoxia kivételével mind megemelték az MsOxprot géntermék szintjét, bár a sebzés csak kisebb mértékben. A kiszáradás okozta háromszoros géntermékszint növekedés három óra elteltével már nem emelkedett tovább, azonban a paraquat még ezt követően is fokozni tudta a gén relatív kifejeződését. A 37°C-os hőstressznek kitett steril növényeknél a kontrollhoz képest 8 és 24 óránál is kb. négyszeres géntermék szint növekedést tapasztaltunk. A kapott eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a gén jelentős szerephez jut az oxidatív stresszválasz során.

Munkatársam (Dunainé Fodor Csilla) rendelkezésemre bocsátott egy különböző stressz és hormonhatásoknak kitett kéthetes csíranövényekből készült cDNS sorozatot, mely esetében 4 óránál történt mintavételezés. Ezeken is megvizsgáltuk az MsOxprot gén relatív génkifejeződését, hogy pontosabb képet kapjunk annak génexpressziós változásairól különböző stressz körülmények között. A kapott eredményeket a 7-17. Ábra szemlélteti.

Az eredmények alapján a különböző stressz és hormonkezelések közül az 1mM hidrogén-peroxid és az 50 μ M abszcizinsav növelte mérsékelten a gén relatív kifejeződését. A kéthetes csíranövényekben a 4 órán keresztül tartó 37°C-os hőstressz nem emelte meg szignifikánsan a géntermék koncentrációját.

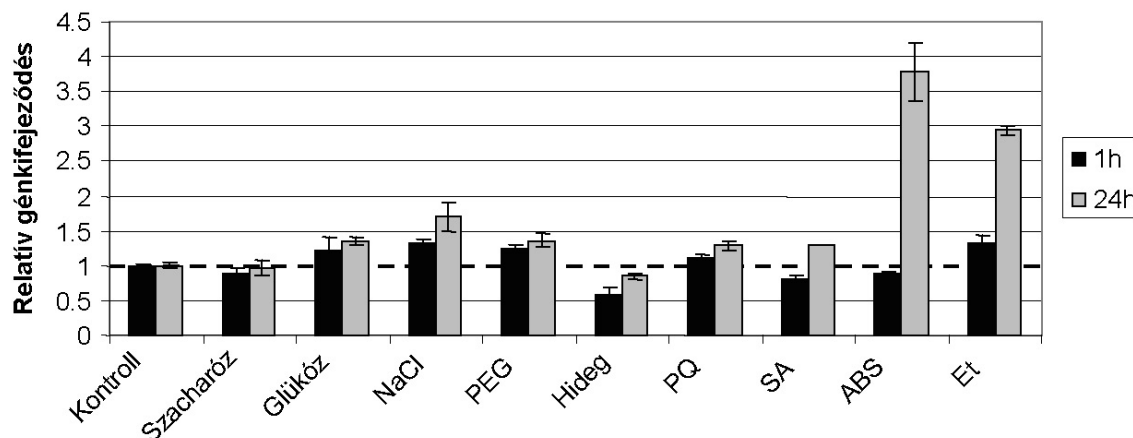


7-17. Ábra. A lucerna MsOxprot gén relatív génkifejeződése különböző stressz és hormonkezelésnek kitett 2 hetes (*Medicago truncatula*) csíranövényeken. A génkifejeződést egy lucerna aktin gén kifejeződésére normalizáltuk. Kezelések: 4°C hideg, 37°C hőstressz, 1mM H₂O₂, 50 µM GS3, 50 µM BAP, 50 µM IES, 50 µM ABS, 100 mM NaCl,

7.2.2.2.2. AtOxprot gén stresszkörülmények alatti vizsgálata

Munkatársam (Manuela Jurca) rendelkezésemre bocsátott egy különböző stressz és hormonhatásoknak kitett háromhetes teljes lúdfű csíranövényekből készült cDNS sorozatot, melyen megvizsgáltuk, hogy adott körülmények között hogyan viselkedik a lucerna MsOxprot gén lúdfű homológja (At5g06260). A rendelkezésemre bocsátott minták esetében 1 és 24 óránál történt mintavételezés, s a kapott eredményeket a 7-18. Ábra mutatja be.

Az AtOxprot gén az ábrán látható stresszkezelések hatására 1 óránál még sehol nem mutatott nagyobb mértékű indukciót, de egy kisebb mértékű represszáció a 4°C-os hidegkezelés során megfigyelhető volt. A kései (24 órás) stresszválasz esetén már emelkedett relatív génkifejeződésről számolhatunk be 100 µM abszcizinsav, valamint egy fény kizárása mellett használt etilén donor (10mg/L Ethephon) hatására. Az oxidatív stressz-ágensként ismert paraquat 25 µM koncentrációban nem indukálta jelentősen a gént egyik időpontban sem a három hetes csíranövények esetében.



7-18. Ábra. A lúdfű *AtOxprot* gén (*At5g0620*) relatív génkifejeződése különböző stressz és hormonkezelésnek kitett 3 hetes *Arabidopsis* csíranövényeken. A génkifejeződést a glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz (*GAPDH2*) gén kifejeződésére normalizáltuk. Kezelések: 8% szacharóz, 300 mM glükóz, 300 mM NaCl, 30% PEG, 4°C hideg, 25 µM paraquat, 10 µM szalicilsav, 100 µM abszcizinsav, 10 mg/L ethephon+sötét

Ezután a korábban az *MsOxprot* esetében elvégzett kísérleteket hajtottuk végre üvegházi vad típusú (*Columbia*) *Arabidopsis* növények levelein, vagyis a levágott leveleket kitettük 10 µM paraquat hatásának, sebzésnek és kiszáradásnak, emellett a sejtszuspenziót hipoxia kezelésnek, valamint az üvegházi növényt pedig 37°C-os hőstressznek. Mivel a különböző hormon és stresszhatásnak kitett háromhetes csíranövények cDNS-ein 1 óránál nem láttunk nagy relatív génkifejeződésbeli változást, a lehetséges nagyobb mértékű korai indukció miatt az első 8 órában gyakrabban került sor mintavételre. (0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h). A kapott eredményeket a 7-19. Ábra szemlélteti.

Az alkalmazott stresszkezelések a szárazság kivételével mind indukálták a gén relatív kifejeződését, PQ esetében már fél óránál emelkedni kezdett a géntermék mennyiségének szintje, két óránál 8-9-szeresére növekedett a kontrollhoz képest, majd a stressz előrehaladtával csökkenésbe kezdett, s 8 óra múltán visszatért közel a kiindulási szinthez. A sebzés esetében lényegében hasonlóan gyors fel- majd lefutást kaptunk a géntermék mennyiségének szintjében, azzal a különbséggel, hogy 0.5 óránál egy kisebb mértékű alulszabályozottság volt megfigyelhető, s a 2 óránál megfigyelhető csúcs kb. ötszöröse volt a kontrollénak.



7-19. Ábra. Az *Arabidopsis* *AtOxprot* gén relatív génkifejeződése különböző stresszkezeléseknek kitett fiatal leveleken. A génkifejeződést a glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz (*GAPDH2*) gén kifejeződésére normalizáltuk. Kezelések: 10 μ M paraquat (levágott levelek paraquat tartalmú vízzel átitatott szűrőpapíron), sebzés (vízes szűrőpapíron fekvő levelek borotvapengével többször megvágva), 37°C hőstressz (üvegházi növény termosztátba helyezve), szárazság (levágott levél nyitott petricsészében hagyva szobahőmérsékleten), hipoxia (sejtszuspenzió közel légmentesen lezárva és himbálva).

Hőstressz esetében 0.5 óránál a kontrollhoz képest megfigyelhető mintegy feleakkora relatív génkifejeződés 1 óránál már szintén felülszabályozottságba ment át, s a kísérlet befejeztéig (8h) folyamatosan növekedett, ahol valamivel több, mint hatszoros szintet ért el a kontrollhoz képest. A sejtszuspenzió végzett hipoxia/anoxia kezelés során a gén hasonlóan viselkedett a PQ kezelésnél tapasztaltakhoz azzal a különbséggel, hogy két óránál valamivel kevésbé, 6-7-szeresére indukálódott.

7.2.2.2.3. *AtOxprot* gén potenciális szerepe a hipoxiára adott válaszreakcióban

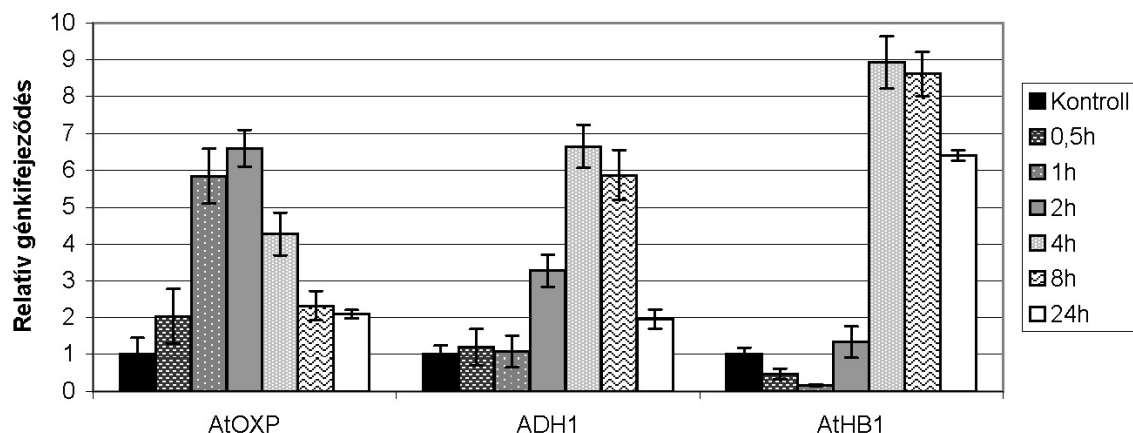
A lucerna és lúdfű „Oxprot” homológok különböző stresszkezelések során nagyon hasonlatos génkifejeződési mintázatokat mutattak, de némi különbség mégiscsak felmerült. Míg az *AtOxprot* a kiszáradásos stresszkezelés során nem mutatott válaszreakciót, addig az *MsOxprot* esetében a hipoxia/anoxia kezelés nem indukálta a

gént. Az AtOxprot hipoxiás válaszreakciója felkeltette az érdeklődésünket, és a gént ebben az irányban további vizsgálatoknak vetettük alá.

Hogy biztosak lehessünk benne, hogy az általunk választott módszernél (15 ml-es csövek egy kis légbuborék kivételével teljesen megtöltve azonos sűrűségű [3ml ülepedett sejt/15ml folyékony tápoldat] 3 napos sejtszuspenzióval, majd körbeforgó himbára helyezve) a hipoxia/anoxia bekövetkezik, egy az irodalmi adatok szerint az adott körülmények között biztosan indukálódó gén, az alkohol dehidrogenáz (ADH1) génkifejeződését is megvizsgáltuk. Irodalmi adatok szerint az ADH1 már az alacsony oxigénszint bekövetkeztétől számított fél órán belül indukálódik és az első 24 órás időtartományban kifejeződése emelkedett szinten marad (Liu és mtsai. 2005). Mindez alkalmassá tette arra, hogy az általunk használt módszerben a hipoxiás/anoxiás körülmények bekövetkeztét jelezze. Emellett vizsgáltuk a lúdfű egy nem szimbiotikus hemoglobin génjének (AtHB1 vagy AtGLB1) relatív kifejeződését is, melynek emelkedett expressziós szintjéről korábbi tanulmányok szintén beszámoltak hipoxiás körülmények között (Trevaskis és mtsai. 1997).

Az általunk végzett kísérlet során e két markergén relatív génkifejeződésére azért voltunk kíváncsiak, hogy megtudjuk, vajon az AtOxprot hipoxiás/anoxiás körülmények között az adott géneknél hamarabb, velük együtt, vagy később indukálódik-e.

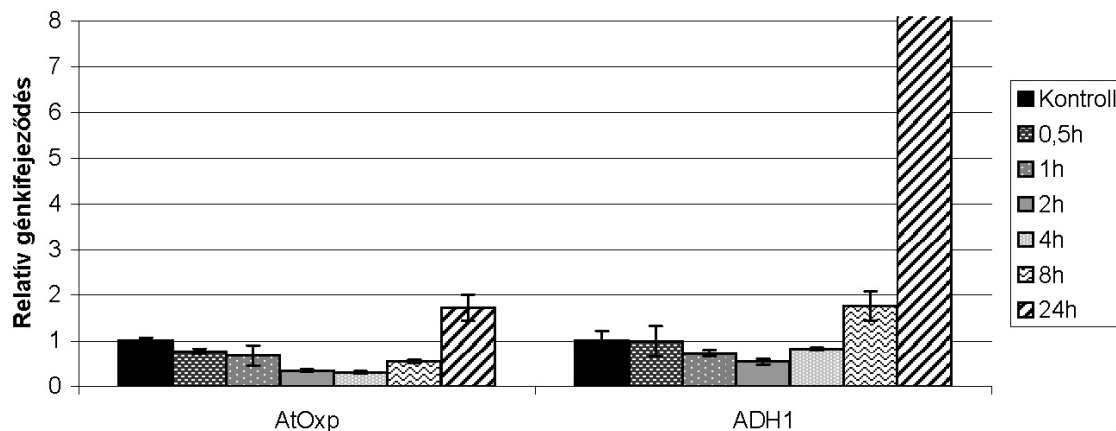
Az AtOxprot gén tehát a hipoxia kezelés során egy gyors indukálódást mutatott, amely 8 óra múltán visszatért közel a kiindulási szinthez (7-20. Ábra).



7-20. Ábra. Relatív génkifejeződés hipoxia kezelt vad típusú (*Col wt.*) lúdfű sejtszuspenzióban. A génkifejeződést a glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz (GAPDH2) gén kifejeződésére normalizáltuk. AtOXP: AtOxprot vizsgált gén, AtHB1: nem szimbiotikus hemoglobin, ADH1: alkohol-dehidrogenáz

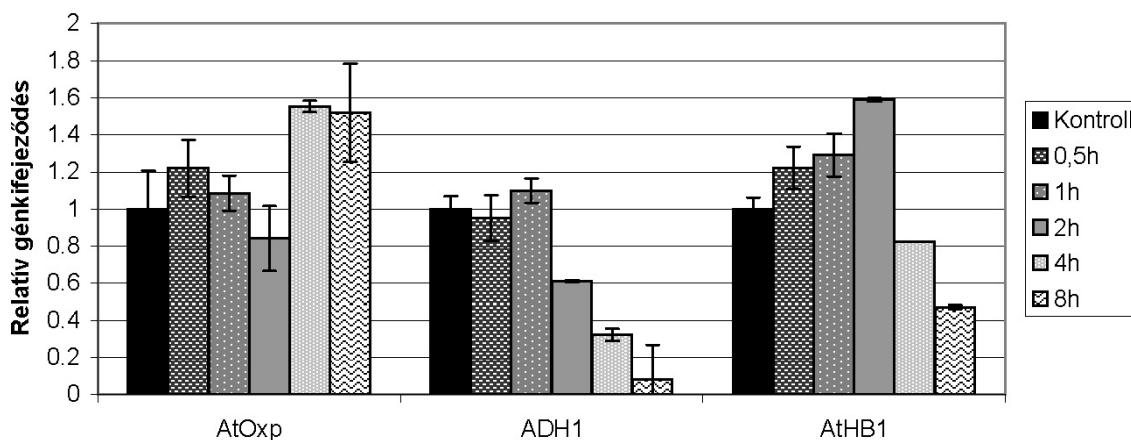
Kísérletünk során a vizsgált időtartamon belül az ADH1 gén relatív génkifejeződése is megemelkedett, mely arra utalt, hogy a rendszer alkalmas a hipoxiás/anoxiás stressz körülmények biztosításához. A géntermék mennyisége az AtOxprot-hoz képest valamivel később, 1 óra után kezdett emelkedni, s a vizsgált időtartományon belül emelkedett szinten maradt. A hemoglobin gén (AtHB1) kezdeti alulszabályozottsága két óra múltán szűnt meg, s a géntermék szintje ezután kezdett nagymértékű emelkedésbe. Az ADH1 génhez hasonlóan a stresszindukció kezdetétől számítva a negyedik órában mutatta a legmagasabb génkifejeződést.

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy hipoxia stressz során a növényekben jelentős mennyiségű nitrogén-oxid is képződik, mely molekula sok stresszel kapcsolatba hozható jelátviteli útvonal részese (Dordas és mtsai, 2003). Kíváncsiak voltunk, hogy a NO szabályozza-e az AtOxprot gén kifejeződését normoxiás körülmények között. Ezért a vad típusú sejtszuspenzió kezeléséhez egy általánosan használt NO donort, a nátrium nitroprusszidot (SNP) használtunk 1 mM koncentrációban. Mivel az SNP fényérzékeny, s bomlástermékei között kálium-ferricianid is található, ezért negatív kontrollként inaktivált SNP-t (iSNP), egy napig direkt fénynek kitett SNP oldatot alkalmaztunk ugyanazon koncentrációban, mint aktív változatát, hogy biztosak lehessünk abban, hogy a kapott hatást az NO, és nem a szer egyéb bomlásterméke váltotta ki. A kezelés eredményeképpen az AtOxprot géntermék mennyiségében már fél óránál csökkenés kezdődött, amely két óránál a kontroll szint harmadáig csökkent, 8 óra múltán emelkedni kezdett, s 24 óra elteltével kismértékű kontroll szint feletti emelkedést figyelhettünk meg. Ez a mintázat lényegében az ADH1 gén esetében is megfigyelhető volt, de az alulszabályozottság mértéke gyengébb volt, s már 8 óránál emelkedett szintet mutatott a kontrollhoz képest. 24 óra elteltével génkifejeződése több, mint tízszeresére növekedett. A kapott eredményeket a 7-21. Ábra mutatja.



7-21. Ábra. Relatív génkifejeződés az 1 mM SNP-vel kezelt vad típusú lúdfű sejtuszuspenzióban az 1 mM iSNP-vel kezelt sejtekhez képest. Belső kontrollként a génkifejeződést a gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz (GAPDH2) gén kifejeződésére normalizáltuk. AtOxp: At5g06260 vizsgált gén, ADH1: alkohol-dehidrogenáz (az ADH1 kifejeződése 24h-nál több, mint tízszeres volt)

A hidrogén-peroxid szerepe a növények alacsony oxigénszint által kiváltott stresszválaszában szintén már bizonyítást nyert. Például az anoxia-érzékeny búza gyökerében (*Triticum aestivum*) szignifikáns hidrogén-peroxid szint emelkedést tapasztaltak anoxia stresszt követően, ellenben az anoxia-toleráns írisz (*Iris pseudacorus*) rizomájának parenchima szöveteiben nem. Mindez arra utal, hogy alacsony oxigénszint által kiváltott stressz során a hidrogén-peroxid jelként funkcionál (Blockhina és mtsai., 2001). Ezért szintén megvizsgáltuk a 2 mM H₂O₂ vad típusú sejtuszuspenziós sejtek génkifejeződési mintázatára kifejtett hatását a fent említett időpontokban normoxiás körülmények között. Az AtOxprot gén relatív kifejeződése az első két órában csak kis mértékben tért el a kontroll szinttől, de 4 óra múltán is csak enyhe felülszabályozottságról beszélhetünk. Az ADH1 gén relatív génkifejeződése 8 óra elteltével fokozatosan a tizedrészére esett vissza, mely gén expresszióját tehát erőteljesen érintette a hidrogén-peroxid kezelés. Az AtHB1 gén kezdeti kismértékű felülszabályozottsága 4 óra elteltével alulszabályozottságba ment át. A kapott eredményeket a 7-22. Ábra szemlélteti.



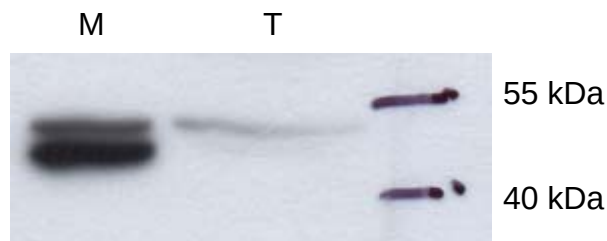
7-22. Ábra. Relatív génkifejeződés a 2 mM H_2O_2 -vel kezelt vad típusú lúdfű sejtuszuspenzióban. A génkifejeződést a gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz (GAPDH2) gén kifejeződésére normalizáltuk. AtOxp: At5g06260 vizsgált gén, ADH1: alkohol-dehidrogenáz

7.2.3. „OXPROT” fehérje vizsgálatok

7.2.3.1. MsOxprot fehérje lokalizációja

A lucerna különböző növényi szerveiből és a stresszkezelt mintákból izolált fehérjemintákon készült Western blot analízisek során a teljes MsOxprot fehérje ellen nyúlban termeltetett ellenanyag meglehetősen gyenge jelet adott a megfelelő magasságban még nagy felvitt fehérjemennyiség mellett is, így a gyenge jel miatt nem sikerült korrelációt felfedezni a valós idejű PCR által detektált stresszhatásra megemelkedő géntermék mennyisége és a fehérjeszint között.

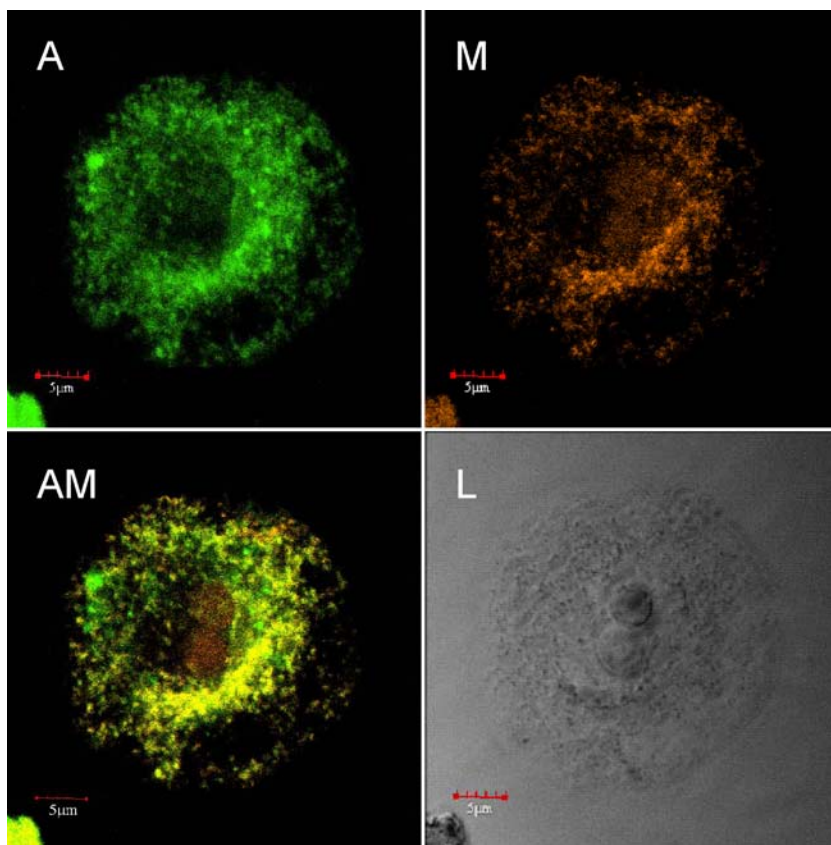
Abból kiindulva, hogy az élesztő és humán OXR1 fehérje funkcionális működéséhez szükséges a mitokondriális lokalizáció, *Medicago sativa* A2 sejtuszuspenzióból mitokondriumot tisztítottunk, majd azt Western blot segítségével megvizsgáltuk. (7-23. Ábra) A mitokondriális frakcióban a saját ellenanyaggal kapott jel felerősödött, míg zöld növényből tisztított kloroplasztiszban, vagy más organelumban nem sikerült fehérje jelenlétet kimutatni.



7-23. Ábra. Az MsOxprot fehérje Western blot analízise M: mitokondriális frakció, T: teljes sejtkivonat

A Western blot analízisen kapott eredményeket megpróbáltuk alátámasztani immunolokalizáció segítségével is, ám az MsOxprot ellen nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyag nagy háttérjel képzése miatt nem volt alkalmazható lucerna levélprotoplasztokon megkísérelt immunolokalizáció végzéséhez.

Ezért MsOxprot-HA fehérjét túltermelő lúdfű gyökér eredetű sejtszuspenziós kultúrát hoztunk létre *Agrobacterium*-közvetített transzformáció segítségével, majd protoplasztokat izoláltunk belőle és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk egér monoklonális HA ellenanyag és Alexa 488-kapcsolt kecske egér-elleni IgG felhasználásával. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével készített felvételeken jól látható, hogy a zöld színben fluoreszkáló Alexa 488-jelölt HA ellenanyag és a narancssárga színben fluoreszkáló MitoTracker mitokondriális marker jele átfed egymással (7-24. Ábra). Mindez alátámasztotta az MsOxprot-tal kapott immunoblot eredményeket, mely szerint a fehérje mitokondriális lokalizációjú, igaz adott kísérletben nem lucerna, hanem *Arabidopsis* háttérben.

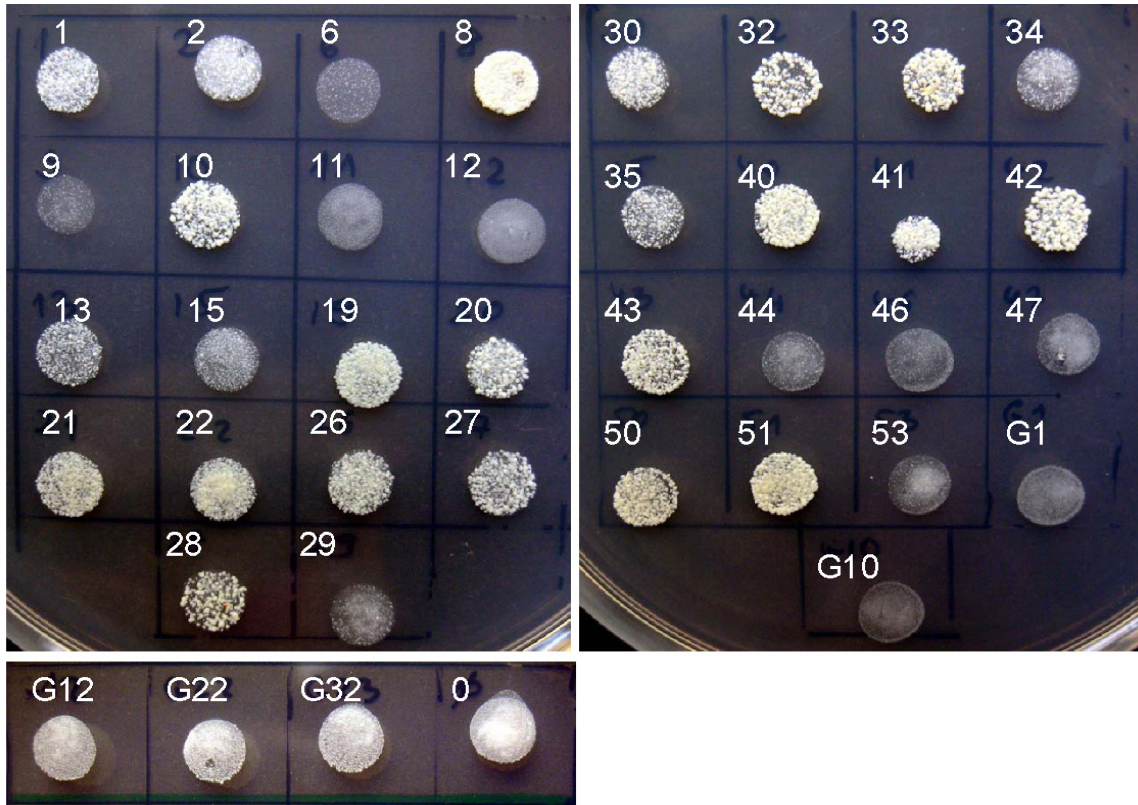


7-24. Ábra *MsOxprot-HA túltermelő Arabidopsis protoplaszt immunfestése. M - MitoTracker Orange fluoreszcens jele, A – Alexa 488-jelölt HA-elleni ellenanyag zöld fluoreszcens jele, AM – Alexa 488 és MitoTracker átfedő jele, L - a protoplaszt áteső fehér fényben. A vonal 5 μm -t mutat.*

7.2.4. Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata élesztőben

7.2.4.1. AtOXPROT fehérje vizsgálata élesztő kéthibrid rendszerben

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a lúdfü AtOXPROT fehérje milyen egyéb fehérjékkel áll kölcsönhatásban, ezért egy Arabidopsis sejtszuszpenzióból készült cDNS-könyvtárat (Arabidopsis Molekuláris Genetika Csoport, MTA SZBK) teszteltünk élesztő kettős hibrid rendszerben. A His⁺ fenotípust mutató élesztő telepekből izoláltuk az ismeretlen cDNS-t hordozó vektort, majd azokat visszaellenőrzés céljából ismét visszajuttattuk az AtOxprot-ot megfelelően tartalmazó élesztő sejtekbe (7-25. Ábra).



7-25. Ábra. Az élesztő két-hibrid rendszerben azonosított lúdfü sejtszuszpenziós cDNS könyvtárból származó AtOxprot kölcsönható partnerek visszaellenőrzése 3 szelekciós táptalajon. A következő klónoknál nem találtuk megfelelően erősnek a His⁺ fenotípus: 6, 9, 11, 12, 29, 44, 46, 47, 53, G1, G10

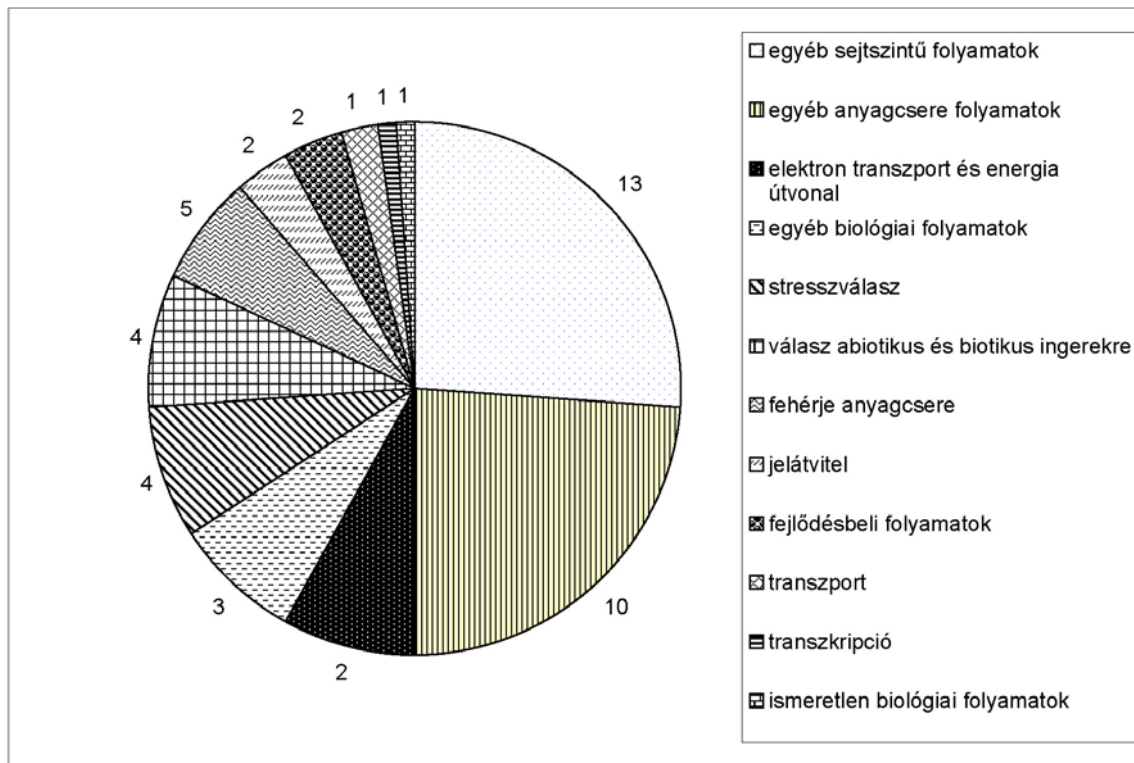
A kölcsönhatások újra történő leellenőrzése, valamint a klónok osztályozása után végül 39 klónból 18 fehérje kölcsönható partnert sikerült azonosítani, melyeket a 7-2. Táblázat tartalmaz.

A gén-nevezéktani kifejezések segítségével az azonosított kölcsönható partnerek funkcionális kategóriákba történő osztályozását 7-26. Ábra szemlélteti. A kölcsönható partnerek között 4 gén kifejezetten stresszválaszt nyújtó gén (RD2, ERF4, LOS2, Disease-resistance protein related), s mellettük abiotikus és biotikus ingerekre választ ad még az AUX1 elnevezésű, auxin transzportban szerepet játszó gén is. Emellett szembeötlő a fehérje anyagcserében (EF-P family protein, MAP2A, ARP1, protein kinase family protein) és egyéb anyagcsere folyamatokban (alfa-galactosidase, ATNIFS1) szerepet játszó gének nagy száma is. A fennmaradó gének által kódolt fehérjék változatos biológiai funkciókat töltenek be.

Klón azonosító	A. th gén	Arabidopsis fehérje neve	Funkció
1; 30	AT2G38120	AUX1 (Auxin Resistant 1)	TR, DEV
2	AT2G21620	RD2 (Responsive to dessication 2)	S
21	AT3G28180	CSLC04 (Cellulose synthase-like C4)	BIO
22	AT1G09230	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	DNA
26; 32	AT1G10740	similar to unknown protein	ET
27	AT3G08740	elongation factor P (EF-P) family protein	PM
28	AT2G44180	MAP2A (Methionine Aminopeptidase 2A)	PM
34	AT3G56310	alpha-galactosidase	M
35	AT3G15210	ERF4(Ethylene Responsive Element Binding Factor 4)	S, ST, T
41	AT5G42850	electron carrier/ protein disulfide oxidoreductase	C
42	AT1G43170	ARP1 (Arabidopsis Ribosomal Protein1)	PM
43	AT2G22470	AGP2 (Arabinogalactan-protein 2)	BIO
51	AT5G65720	ATNIFS1 (Arabidopsis Th. Nitrogen Fixation Homolog 1)	M
8,10,19,20, 33,40,	AT3G12965	other RNA	BIO
15	AT2G36530	LOS2 (Low expression of osmotically responsive genes 1)	S
9	AT5G40090	disease resistance protein-related	S, ST
G12	AT1G78040	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	ET
G22	AT1G53050	protein kinase family protein	PM

7-2. Táblázat. A 18 azonosított Arabidopsis thaliana L. cDNS-ekhez tartozó gén és az általuk kódolt fehérjék feltételezett biológiai funkciója. BIO-biológiai folyamatok, C-sejtszintű folyamatok, DNA-DNS vagy RNS kötés, DEV-fejlődésbeli folyamatok, ET-elektron transzport, M-anyagcsere folyamatok, PM-fehérje anyagcsere, S-stresszválasz, ST-jelátvitel, T-transzkripció, TR-transzport

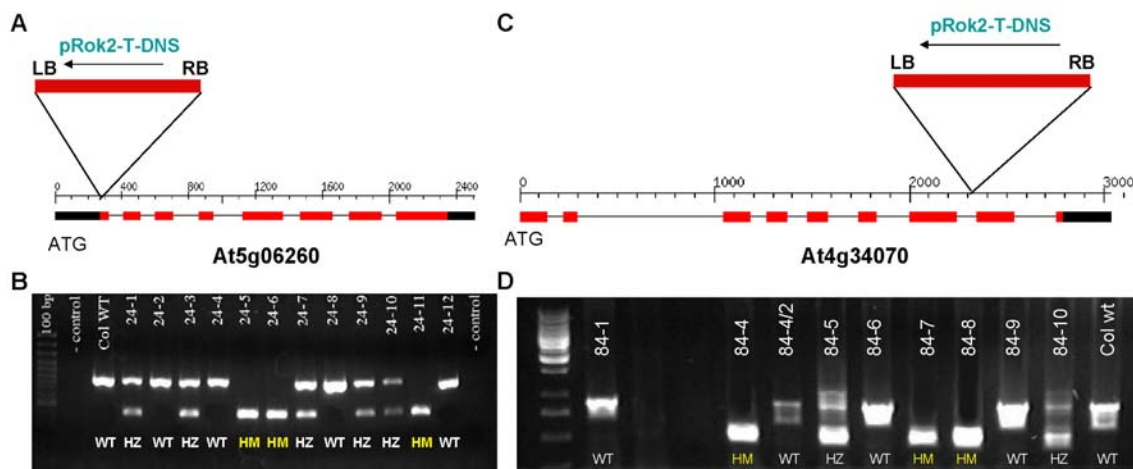
A tény, hogy az AtOXPROT fehérje kölcsönhatásban áll több stresszel is kapcsolatba hozható fehérjével alátámasztja, hogy feltehetően szerepet játszik a különböző stresszekkel szembeni rezisztencia kialakításában.



7-26. Ábra. Az azonosított *Arabidopsis* cDNS szekvenciák által kódolt fehérjék funkcionális kategóriákba történő osztályozása. Az osztályozás a gén-nevezéktani kifejezések (gene ontology, GO) közötti automatikus keresésen alapszik, így egy fehérje több csoportba is sorolható (a különböző kategóriákba sorolt fehérjék száma az ábrán látható.)

7.2.5. Növényi vizsgálatok

A SALK Intézetnél elérhető volt mind a két lúdfű homológ (At5g06260, At4g34070) génjéhez tartozó T-DNS inszerciós mutáns (N593924, N124884), így azok magjait megrendeltük, s a T-DNS-t határoló genomi szekvenciákra primereket terveztünk. A T-DNS specifikus (LB) illetve genomi primerekkel PCR-t hajtottunk végre, mely alapján homozigóta és heterozigóta növényi vonalakat sikerült azonosítanunk. (7-27./B, 7-27./D ábra) Az N593924-es számú mutáns esetében a T-DNS inszerció a gén első exonjába 300bp környékén épült be (7-27./A ábra), míg a N124884-es mutáns esetében az At4g34070-es gén hetedik intronjába, 2300 bp környékén integrálódott be (7-27./C ábra)



7-27. ábra. Az lúdfü homológok T-DNS mutánsainak inszerciós képe és a beépült T-DNS-re nézve homozigóta egyedek kiválogatása PCR segítségével. A)B) Az At5g06260 génhez tartozó N593924-es számú T-DNS mutánsban az inszerció helye, valamint a homozigóta egyedek génspecifikus és LB primerek segítségével történő azonosítása C)D) az At4g34070 génhez tartozó N124884-es mutánsban az inszerció helye és a homozigóták PCR-ral történő azonosítása, WT- vad típus, HZ-heterozigóta. HM-homozigóta

Mindkét mutáns esetében 3 homozigóta vonalat sikerült azonosítani, melyek magjait felszaporítottuk, s azokkal különböző stressz körülmények között (4 °C, 0.5 µM ABS, 150 mM Glükóz, 300 mM Mannitol, 8% Szacharóz, 150 mM NaCl, 100 µM CdCl₂, 2 mM H₂O₂, 0.3µM PQ, 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mM SA) csírázási tesztet hajtottunk végre.

A várakozással ellentétben azonban egyik mutáns sem bizonyult érzékenyebbnek a vad típusnál egyik stressz körülmény között sem. A génkomplementáció lehetősége miatt a homozigóta mutánsokat kereszteztük dupla mutánsok elérésének céljából, melyek további vizsgálatok tárgyát képezik majd. Egyelőre a keresztezett növények homozigóta magjaival történő csírázási tesztekéről nincs adatunk.

8. Megvitatás

A növényi embriogenezis korai szakaszának tanulmányozása nagyon nehéz. A megtermékenyítés és embriófejlődés az anyai szövetekbe mélyen beágyazva zajlik, így a közvetlen megfigyelés nem lehetséges. Az elmúlt évtizedek alatt a kutatók számos eltérő megközelítést dolgoztak ki a probléma megoldására. Az egyik megközelítés a növényeknek egy alapvető biológiai sajátosságán alapul: bizonyos növények és sejttípusok esetében lehetőség van az embriófejlődés elindítására testi (szomatikus) sejtekben *in vitro*. Ez a szomatikus embriogenezis jelensége, amely nagyban megkönnyíti az embriófejlődés tanulmányozását, hiszen ebben az esetben az embriók nagy tömegben állíthatók elő és szabadon vizsgálhatóak. Egy másik megközelítést tett lehetővé a mikromanipulációs technikák fejlődése kiegészülve az *in vitro* megtermékenyítés lehetőségével. Mindkét esetben felmerül azonban a kérdés, hogy a mesterséges tenyésztési körülmények mennyiben befolyásolják a sejtek fejlődését. A tényleges *in planta* események tanulmányozásában nagy előrelépést jelentett egyes lúdfű mutánsok tanulmányozása és a genomikai módszerek alkalmazása.

Laboratóriumunkban az elsőként említett megközelítést alkalmaztuk, hogy megvilágítsuk az embriogenezis kezdeti lépéseinek néhány élettani aspektusát.

8.1. A lucerna (*Medicago sp.*) szomatikus embriogenezise, mint kísérleti modell

A *Medicago* fajok közül elsőként a *Medicago sativa* L. esetében írtak le szomatikus embriogenezist (Sanders és Bingham 1972). Azóta számos *Medicago* faj esetében sikerült szomatikus embriókból növényeket regenerálni (Iantcheva és mtsai. 2006). Ezek között találunk diploid, tetraploid, poliploid, illetve évelő és egynyári fajokat. A *Medicago* fajok és a szomatikus embriogenezis vonatkozásában éppen a nagy genetikai változatosságot érdemes megemlíteni, ami nemcsak az egyes fajok, hanem az egyes genotípusok (fajták, vonalak) között is megfigyelhető, különös tekintettel az évelő, idegen beporzó fajokra (pl. Brown 1988, Brown és Atanassov 1985). A legtöbb kísérleti

adat, nem utolsó sorban gazdasági jelentősége miatt, *Medicago sativa* L. esetében áll rendelkezésre, de napjainkban a *Medicago truncatula* Gaertn. faj, mint a pillangós virágú növények egyik modell növénye, szintén a kutatások előterébe került (pl. Araujo és mtsai. 2004, das Neves és mtsai. 1999, Duque és mtsai. 2006, Nolan és mtsai. 1989).

A nagy genetikai változatosság természetesen változatos tenyésztési rendszerek kidolgozásához vezetett. Az esetek többségében a gyökér, levél, vagy levélnyél explantumból először differenciálatlan kallusz szövetet indukálnak és ezt követően, a kallusz felszínén fejlődnek a szomatikus embriók. Ez a szomatikus embriogenezis ún. „közvetett” útja, amely lényegében megegyezik azzal, amit a sárgarépa esetében ismertettünk. Talán a legjobban jellemzett ezek közül az, amelyet Györgyey és munkatársai (Dudits és mtsai. 1991, Györgyey és mtsai. 1991, Györgyey és mtsai. 1997) dolgoztak ki. Ebben a rendszerben a gyökér explantumból képződött kallusz sejteket folyadék tápközegben tartják fenn 15 μM naftilecetsav (NES) jelenlétében. Az így létrehozott tenyészetben különböző méretű dedifferenciált sejtkolóniák, ún. mikrokalluszok, figyelhetők meg („microcallus cell suspension” vagy „MCS”). Ezekben a sejtekben egy rövid (1-3 órás) magas koncentrációjú (100 μM) 2,4-D kezeléssel váltható ki a szomatikus embrió fejlődés, ami auxin mentes tápoldatban való további tenyésztést követően mintegy három-hat héten belül következik be. Így ez a kísérleti rendszer alkalmasnak tűnik a közvetlen 2,4-D hatás és az embrió fejlődés időbeni elválasztására. Így került sor többek között a hősokk, illetve sejtciklus szabályozó gének expressziója és a szomatikus embriogenezis közötti kapcsolat feltárására (Dudits és mtsai. 1991, Györgyey és mtsai. 1991, Györgyey és mtsai. 1997, Szűcs és mtsai. 2006).

Az ún. „közvetlen” szomatikus embriogenezis rendszerek esetében a kallusz képződés nem figyelhető meg. 2-4 mm méretűre vágott *Medicago sativa* subsp. *falcata* (Denchev és mtsai. 1991) vagy *M. truncatula* (Iantcheva és mtsai. 2001) levél explantumok sebzési felszínén szomatikus embriók közvetlen kifejlődését írták le. Ezekben a rendszerekben az embriogenezis hatékonysága a sebzés mértékének függvénye.

A leghatékonyabb sebzési eljárás a protoplasztálás, amely a sejtfal enzimátikus eltávolítását jelenti (áttekintésként Fehér és mtsai. 2005). Bögre és munkatársai (Bögre és mtsai. 1990) igazolták, hogy lucerna levélprotoplasztokból közvetlenül nevelhetőek fel

szomatikus embriók. A rendszer előnye, hogy a folyamat egyedi sejtekben váltható ki, többé-kevésbé szinkronizált módon, és függ az auxin (2,4-D) koncentrációtól és a genotípustól. Bár a levélprotoplasztokból kiinduló szomatikus embriogenezis végső hatékonysága nem nagy (százezer protoplasztból kiindulva kb. száz embrió nevelhető fel; (Bögre és mtsai. 1990), a kiindulási sejtpopuláció nagyon homogén megjelenésű.

Ezek azok az előnyök, amelyek miatt mi is ezt a kísérleti rendszert választottuk, hogy tanulmányozhassuk a sejtosztódás és az embriófejlődés programjának aktiválódását növényi testi sejtekben. Választásunkat megerősítette, hogy ezekben a sejtekben az embriogén képességgel kapcsolatba hozható markerek (AGL-15, *serk1*) már kifejeződnek, és morfológiai, valamint fiziológiai jellemzőik is jól elkülönítik őket az ezzel e képességgel nem rendelkező sejtektől (Bögre és mtsai. 1990, Fehér és mtsai. 2005, Pasternak és mtsai. 2002).

8.2. A lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben indukált szomatikus embriogenezis során azonosított gének jellemzése

A protoplaszt eredetű sejtekben indukálódó szomatikus embriogenezis egy összetett folyamat, mely magában foglalja a sejtek felépülését az izoláció következtében fellépő stressz nyomán, az új sejttel szintézisét, a sejtosztódást, valamint az embriogén sejtorsó felé való elköteleződést. Azt feltételezhetjük, hogy a tápközeg 2,4-D koncentrációjának emelkedése mindezekre a paraméterekre hatással van. Mindezt alátámaszthatjuk azon gének azonosításával, melyek génkifejeződése megnőtt a magas (embriogén) 2,4-D koncentráció hatására lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtekben.

Kijelenthetjük, hogy az azonosított fehérjék funkciója kapcsolatban áll a sejt szintű újraszerveződéssel beleértve a stresszválaszokat (patogenezishez köthető, valamint hősokk fehérjék, GST-transzferáz), a sejten belüli membrán transzportot és szekréciót (kis GTP-kötő fehérjék), a fehérje szintézist (elongációs faktorok, riboszomális fehérjék) és a sejtmagi folyamatokat (hisztionok, magi transzport fehérjék).

Hogy jobb betekintést nyerhessünk abba, hogy az azonosított géneknek milyen szerepe van a szomatikus embriogenezis összetett folyamatában, a különböző

funkcionális csoportokat jól reprezentáló 11 gén kifejeződését két független rendszerben vizsgáltuk.

Hogy a génkifejeződés 2,4-D koncentráció függését megerősítsük, fiatal lucerna leveleket 1 és 10 μM 2,4-D tartalmú folyadék tápközegben úsztattuk négy napig, három független kísérletben. Egy kivételével (2_19_2F) minden vizsgált gén emelkedett kifejeződést mutatott a negyedik napon a magas 2,4-D koncentráció hatására az alacsonyabb koncentrációhoz képest. A megkésett (negyedik napos) génaktiváció az jelzi, hogy a gének nem közvetlenül a 2,4-D-re válaszolnak, de kifejeződésük egyenes következménye a 2,4-D hatására beinduló sejtszintű változásoknak. A fent említett eredmények jól összecsengenek azzal a ténnyel, hogy ezeket a géneket az 1 μM 2,4-D-hez képest 10 μM 2,4-D jelenlétében magasabb szintű kifejeződésük alapján izoláltuk négy napos protoplasztokból.

Az *Arabidopsis* LEC1 gén lucerna megfelelője szintén jelentősen megnövekedett kifejeződést mutatott a magasabb 2,4-D koncentráció hatására, mely már önmagában jelentheti a fejlődés embriogén útvonalának megkezdődését. Ezekben a mintákban azonban a LEC1 kifejeződése számos nagyságrenddel az aktin gén kifejeződési szintje alatt maradt, mely jelezheti azt, hogy a gén kifejeződése általában véve nagyon alacsony, vagy még valószínűbb, hogy csupán néhány sejtre korlátozódik.

Meg kell említenünk, hogy ez a kísérleti rendszer azon gének azonosításának kedvezett, melyek géntermékei nagy mennyiségben fordultak elő. Ezt jól jelzi az aktin gén kifejeződéséhez hasonló génexpressziós szintjük. Figyelembe véve a LEC1 gén alacsony kifejeződési szintjét a mintákban, igen valószínűtlen, hogy a hasonlóan alacsony expressziós szintű szabályozó gének ezzel a megközelítéssel azonosíthatóak lennének.

Hogy a szomatikus embriogenezis folyamán tovább vizsgálhassuk a 2,4-D génkifejeződésre gyakorolt közvetlen hatását, egy időben hosszabban elnyúló kísérleti rendszerrel is végeztünk vizsgálatokat. Ehhez a Györgyey János által kidolgozott sejtenyésztési rendszert alkalmaztuk, ahol a sejteket 1 órára igen magas, 100 μM 2,4-D hatásának tették ki, majd ezt követően a sejteket mosták, és 6 héten keresztül hormonmentes táptalajon tartották fenn. Ebben a rendszerben a harmadik héten szomatikus embriók jelentek meg a tenyészetben. Génkifejeződési vizsgálatot az

embriogén kompetencia kialakulásánál (első nap), és a szomatikus embriók megjelenésének idején (1-6 hét) végeztünk.

A rövid idejű, de igen magas koncentrációjú 2,4-D hatására válaszképpen 6 gén mutatott megnövekedett relatív génkifejeződést. A stresszgének magasabb expressziója feltehetően a 2,4-D stressz-indukáló hatásának, a tenyészetet érő kezelésnek és a sejtek hormonmentes körülmények közé történő áthelyezésének tulajdonítható (Romero-Puertas és mtsai. 2004). A 2-6_RAB elnevezésű gén, mely egy az AtRABF2 génhez homológ kis RAB GTP-áz fehérjét kódol, magas relatív génkifejeződése az endocitikus folyamatok fokozódását jelezheti. Ugyanezen fehérjéről már kimutatták, hogy cikóriában a szomatikus embriogenezis korai szakaszában ozmotikus és hőstressz során indukálódik (Randoux és mtsai. 2002), így ez a gén/fehérje a szomatikus embriogenezis kezdeti szakaszának általános markereként szolgálhat.

Noha a mérési időpontok közti különbség, valamint az eltérő kísérleti körülmények miatt az egész levelek (7-5/A) és sejtszuspenzió tenyészetek (7-6/A) esetén kapott kifejeződési mintázatok nem vethetők össze közvetlenül a kapott eredményekkel, hasonlóság fedezhető fel a két rendszer között, ha figyelembe vesszük a stresszhez kapcsolható gének 2_16_GST és 3_13_PR megnövekedett expresszióját.

A stresszválaszok és a szomatikus embriogenezis indukciós szakasza közötti kapcsolat már jól ismert tény (Pasternak és mtsai. 2002, Ikeda-Iwai és mtsai. 2003, Ötvös és mtsai. 2005, Thibaud-Nissen és mtsai. 2003, áttekintésként Fehér és mtsai. 2003, Fehér 2006). Dajkafehérje (chaperonin) funkcióval rendelkező hősokk fehérjék szoros kapcsolatban állnak a szomatikus embriogenezis folyamatával (Györgyey és mtsai. 1991). A patogenezishez köthető fehérjéket, beleértve a PR10 fehérjét is már összeköttetésbe hozták a folyamattal (Helleboid és mtsai. 1998, Helleboid és mtsai. 2000, Imin és mtsai. 2004), mely csak alátámasztja funkcionális sokrétűségüket, és a sejt védekezési válaszában való szerepüket. A PR10-szerű fehérjék rendelkezhetnek ribonukleáz és/vagy bioszintetikus aktivitással (Park és mtsai. 2004), de konkrét szerepük a szomatikus embriogenezisben eddig nem ismert. A 2,4-D-t, mint indukáló ágenszt használó különböző kísérleti rendszerekben is már közölték a GST-transzferázt kódoló gének szomatikus embriogenezis során megnövekedett kifejeződését (Galland és mtsai. 2001, Kitamiya és mtsai. 2000). A sejt GST szintje és GST-transzferáz aktivitása gyakran kerül

összeköttetésbe a sejtosztódással és a merisztéma kialakulásával (Galland és mtsai. 2001, Vernoux és mtsai. 2000). Az OXR1 fehérje egy olyan eukarióta fehérjecsaládot képvisel, melyet kapcsolatba hoztak az oxidatív stressz-rezisztenciával (Volkert és mtsai. 2000), az oxidatív stressz pedig szorosan kapcsolódik a 2,4-D-indukált szomatikus embriogenezishez (Pasternak és mtsai. 2002, Ötvös és mtsai. 2005).

Egy további hasonlóság a levelek és mikrokalluszok 2,4-D-re adott válasza között, hogy a LEC1 gén kifejeződése megnőtt, bár az első tenyésztési nap során a LEC1 expressziója rendkívül alacsony még 10 μ M 2,4-D jelenlétében is. A LEC1 megnövekedett relatív génkifejeződése nem kapcsolható közvetlenül a 2,4-D hatásához, mivel a kezeléshez képest jelentős késéssel jelenik meg. A mikrokallusz rendszerben a LEC1 kifejeződése folyamatosan növekedik 2,4-D jelenléte nélkül, majd a hatodik hét környékére –amikor a szomatikus embriók megjelennek- több mint ezerszeres relatív génkifejeződési szintet ér el. Feltételezhetjük, hogy a 2,4-D kezelés csupán néhány, a szomatikus embrióvá történő fejlődés irányában elkötelezett sejtben eredményez LEC1 kifejeződést. A LEC1-et expresszáló sejtek osztódása miatt növekszik folyamatosan a géntermék relatív mennyisége, mely akkor éri el a maximumát, amikor a mikrokallusz felületén megszorodnak a szomatikus embriók.

Érdekes, hogy néhány gén, mely a magas 2,4-D koncentrációra válaszreakciót adott az első napon (2_16_GST, 3_13_PR, 1_2 ARF) szintén emelkedett kifejeződést mutatott a szomatikus embriók differenciálódásának idején, 3-6 héttel az egy órás 2,4-D kezelés után, hormonmentes körülmények között. A GST transzferáz fehérjéről már kimutatták, hogy kapcsolatban állnak a szomatikus embriogenezis indukciós szakaszával, bár általános szerepük a növényi sejtek differenciációja/dedifferenciációja során csupán feltételezett (Galland és mtsai. 2001). A patogenezishez köthető PR10 fehérje nagy mennyiségben fordult elő *Medicago truncatula* gömb-stádiumú szomatikus embrióiban (Imin és mtsai. 2004, 2005), mely arra utal hogy a patogén válaszreakció mellett szerepe van a növényi fejlődésben is. A sejten belüli funkciója ezekben az embriogén sejtekben még nem tisztázott.

A növényi ARF-típusú kis GTPáz fehérjéknek a sejten belüli fehérje szállításban (Gebbie és mtsai. 2005) van szerepük, de összeköttetésben állnak a poláris auxin transzporttal is (Geldner és mtsai. 2003). Azonban az 1_2_ARF által kódolt AtARFC1-

szerű fehérjék határozott funkciója idáig nem ismert (Gebbie és mtsai. 2005, Vernoud és mtsai. 2003).

Ezek a kifejeződési mintázatok kapcsolatban állhatnak a sejtek fejlődésbeni változásával (differenciáltból-dedifferenciáltba való átmenet az első napon a mikrokallusz szuszpenzió és a protoplaszt eredetű sejtek esetében, és dedifferenciáltból-differenciáltba történő átmenet 3-6 héttel a 2,4-D sokkot követően).

A sejtnövekedés/apoptózis kapcsolt (Naora 1999) S3a (5_17_S3) riboszomális fehérjét, valamint a transzkripció általános szabályzásában és sejtnövekedésben/differenciációban résztvevő feltételezett foszfatáz inhibitor, a nukleoszóma-összeszerelő fehérje homológot (1_11_SET) kódoló gének (Adachi és mtsai. 1994, Nowak és mtsai. 2003) szintén megnövekedett relatív génkifejeződést mutattak a harmadik, valamint 3-6. héten a 2,4-D kezelést követően. Ezen gének megnövekedett relatív expressziója a fent említett időszak során összefüggésben állhat a szomatikus embriók megjelenésének és fejlődésének időszakában bekövetkező sejtosztódás és differenciáció folyamatával.

A kapott adatok hangsúlyozzák a testi sejtek dedifferenciált valamint embriogén állapotba történő átmenete során a sejtszintű folyamatok bonyolultságát. Azt szintén kijelenthetjük, hogy a rövid idejű (1 órás) 2,4-D kezelés közvetlen (első napon bekövetkező) és közvetett (3 hét múlva jelentkező) génexpressziós változásokat eredményez, mely arra utal, hogy csupán ez a rövid kezelés is elegendő a sejtek egyedfejlődési programjának megváltoztatásához. Mindezt jól mutatja az embriogenezis-kapcsolt transzkripciós faktor LEC1 gén kifejeződése is.

Noha az azonosított gének expressziója talán használható az embriogén kompetencia megszerzésének és a szomatikus embriók fejlődésének bizonyos stádiumait jelző markerként, a szomatikus embriogenezis folyamatában betöltött funkcionális szerepük bizonyítása még további kísérleteket kíván. Ebből a célból csoportunkban két gént választottunk ki részletesebb jellemzésre: az 1_11_SET foszfatáz inhibitor/nukleoszóma-összeszerelő fehérje illetve a 5_16_OXP oxidatív stressz rezisztencia 1-szerű fehérje (Oxprot) génjét. Ez utóbbi fehérjével kapcsolatban szerzett ismereteinket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

8.3. Az Oxprot gén/fehérje funkcionális vizsgálata

8.3.1. Az OXPROT fehérje mitokondriális lokalizációja és potenciális szerepe az oxidatív stresszel szembeni védekezésben

Az általunk azonosított lucerna OXPROT fehérje és *Arabidopsis* orthológia nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a humán OXR1 fehérjével, amelyről Volkert és munkatársai (2000) kimutatták, hogy képes baktériumokban túltermeltetve megvédeni azokat DNS-ét az oxidatív károsodástól. Továbbá, előállították az élesztő OXR1 fehérje hiányos mutánsát, amely H_2O_2 érzékennyé vált (Volkert és mtsai. 2000).

Elliott és munkatársai (2004) azt is igazolták, hogy az emberi OXR1 fehérje csak akkor vált képessé az élesztő *oxr1*_mutáns törzs komplementálására, ha azt egy mitokondriális célszekvenciával (MTS - Mitochondrial Targeting Sequence) az élesztő mitokondriumokba irányították. Ilyen körülmények között, különösen az általuk használt legmagasabb dózisú hidrogén-peroxid kezelésnél (200 mM H_2O_2 , 1h) a komplementált mutáns törzs a vad típusú törzs rezisztenciáját mutatta. Az MTS szekvencia nélküli OXR1 fehérjét kifejező mutáns törzs viszont éppen olyan érzékenynek bizonyult, mint a kontroll mutáns. Ezek az adatok arra engedtek következtetni, hogy élesztőben a hidrogén-peroxid által indukált letalitás egy mitokondriális folyamat eredménye, és az OXR1 funkcionális működéséhez szükséges a mitokondriális lokalizáció. Arra azonban még nem derült fény, hogy az OXR1 a ROS képződés szabályozásában, vagy a detoxifikációban, illetve az oxidáció kiváltotta apoptózis kivédésében játszik szerepet az emberi sejtekben (Elliott és mtsai 2004).

Eredményeink alapján, miszerint a lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék is képesek komplementálni az *oxr1*_mutáns törzs hidrogén-peroxid rezisztenciáját, kijelenthetjük, hogy az említett fehérjék funkcionális homológjai az élesztő és emberi OXR1 fehérjének. Ha igaz az a feltételezés, hogy az OXR1 fehérje és homológjai csak a mitokondriumban kifejeződve képesek védelmet nyújtani az oxidatív stressz ellen, akkor azt is megállapíthatjuk, hogy a lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék hozzájuk fuzionáltatott élesztő MTS szekvencia nélkül is képesek bejutni az élesztő mitokondriumba. Szekvencia

analízis alapján feltételezhetjük, hogy a növényi OXPROT fehérjék rendelkeznek potenciális mitokondriális cél szekvenciával.

Az MSOXPROT fehérje esetében végzett immunolokalizáció valóban alátámasztja a fehérje mitokondriális kifejeződését, aminek tudatában feltételezhetjük, hogy hasonlóan az élesztő és emberi homológ fehérjékhez, védő szerepet tölt be a növényi mitokondriumokban. E feltételezést alátámasztja, hogy valós idejű PCR segítségével végzett vizsgálatok szerint a fehérjét kódoló gén relatív génkifejeződése többféle abiotikus stresszkezelés hatására is jelentős mértékben megemelkedett.

A mitokondriumok minden eukarióta sejtben megtalálható, egyik legfőbb energiatermelő organelumok. A sejteken belüli energia és redox egyensúly fenntartásában központi szerepük van, és szorosan kapcsolódik hozzájuk számos olyan anyagcsere útvonal, amelyek jelentősek a növények környezeti változásokhoz való alkalmazkodásában (Sweetlove és mtsai., 2007).

A mitokondriumok nem csupán a reaktív oxigén gyökök (ROS) forrásai, de egyben az oxidatív károsodás helyszínei is. Növényekben a mitokondriumoknak normálisan kell működniük a fotoszintézis és fotorespiráció során képződött nagy mennyiségű ROS jelenlétében, melynek mennyisége biotikus és abiotikus stressz folyamán még tovább fokozódik (Taylor és Millar 2007). Azonban a mitokondriumok egyik legfőbb sajátossága, hogy képesek megvédeni magukat (és a sejtet) a túlzott mennyiségben jelen lévő ROS-tól. Ez a főként abiotikus stressz során bekövetkező körülmény arra utal, hogy a növények környezeti stresszel szembeni magas toleranciája a sejtszintű és sejtszint alatti hatékony védekezéssel függ össze. Ehhez a növényi mitokondrium három stratégiát követ (Møller, 2001): az első védekezési szint a ROS termelődésének elkerülése azáltal, hogy az elektrontranszport láncot kellőképpen oxidált szinten tartja, másodikként a ROS-ok detoxifikációját, végül harmadikként a ROS-ok kiváltotta károsodás kijavítását említhetjük. Mivel ez utóbbi két védekezési stratégia az olyan kis antioxidáns molekulák, mint az aszkorbát, glutation és NADPH folyamatos felhasználásával és regenerációjával jár együtt, a ROS képződésének kivédése tűnhet a mitokondrium számára a legelőnyösebbnek (Pastore és mtsai 2006).

8.3.2. Az Oxprot gén abiotikus stressz-indukált kifejeződése

Az abiotikus stressznek rengeteg formája létezik, úgymint a szárazság, hideg-, fagy-, hő-, és sóstressz, táplálékhiány, toxikus nehézfémek, oxidatív stressz, hipoxia, és mechanikus stressz. Noha elfogadott tény, hogy a különböző környezeti stressztényezők sosem járnak egyedül, a növények abiotikus stresszre nyújtott válaszána vizsgálatá általában csupán egy stresszfaktorra korlátozódik. Pedig figyelembe kell vennünk, hogy a stressz mindig több különböző, egymásra ható környezeti tényező összességének folyamánya, mely hozzájárul a stresszválasz mértékének változásához. Vagyis a növények általában a növekedési feltételek egy egyedi komplexére válaszolnak.

Az abiotikus és biotikus stresszfaktorok által aktivált jel és válaszútvonalak között vannak olyanok, melyek átfednek és így lehetővé teszik a sejtek számára a stressz válaszok koordinálását (Hong-bo és mtsai 2006). A lucerna és lúdfű Oxprot gének többféle stresszkezelés hatására is képesek indukálódni (szárazság, sebzés, paraquat, hőstressz, hipoxia) ami alkalmassá teheti őket arra, hogy a stresszválaszok során ilyen összehangoló szerepet töltsenek be. Főként, hogy azt is megfigyeltük, hogy az Oxprot gének stressz aktiválása csak átmeneti jellegű: a stresszkezelést követő 2 óránál tapasztalható génkifejeződési maximum után általában 8 óra elteltével már teljesen visszatérnek az alapszintre. Ez a tény utalhat arra, hogy az oxidatív stressz során elsősorban a jelátvitelben játszanak szerepet, és nem a ROS hosszútávú detoxifikációjában.

Érdekes módon, a lucerna és az *Arabidopsis* Oxprot gének kifejeződésének szabályozása nem minden esetben mutatott egyezést, a *Medicago* gén hipoxiára, az *Arabidopsis* gén szárazságra nem válszolt. Ennek oka lehet, hogy a kezeléseket nem lehet teljes mértékben összevetni, valamint az oxprot gén kifejeződése rendkívül érzékeny a stresszkezelés körülményeire. Bár az sem zárható ki, hogy a két fajban valóban eltér a gén kifejeződésének szabályozása.

Emellett mindkét növényi Oxprot gén mutatott aktivitás növekedést abszcizinsav kezelést követően. Az abszcizinsav szerepe számos stresszválasz, ideértve a vízhiányt és hipoxiát, szabályozásában közismert (de Bruxelles és mtsai. 1996).

Mindezek alapján a növényi OXPROT fehérje szerepe bizonyos abiotikus stresszekre adott válaszreakciókban valószínűsíthető.

Mind a hidrogén-peroxid (Apel és Hirt 2004), mind pedig a nitrogén-monoxid (Arasimowicz és Floryszak-Wieczorek 2007) képes jelátvivő molekulaként viselkedni abiotikus stressz során, szabályozva a növények fejlődését, stressz adaptációját, és a programozott sejthalált (PCD). Kiváncsiak voltunk, hogy az AtOxprot gén működését indukálja-e bármelyikük, hasonlóan a különböző alkalmazott abiotikus stresszkezelésekhez (PQ, sebzés, hőstressz, hipoxia). Azoban az *Arabidopsis* sejtszuspenzió végzett hidrogén-peroxid és SNP (NO-donor) kezelés hatására az AtOxprot teljesen másként viselkedett. Génkifejeződésének indukálásához tehát egyik jelmolekula sem volt megfelelő, azaz az Oxprot gén működését feltehetően nem a ROS képződés váltja ki.

8.3.3. Az Oxprot fehérje potenciális szerepe hipoxia alatt

Liu és munkatársai nagyszabású, hipoxia stressz során bekövetkező génexpressziós változásokat bemutató munkája során számos olyan gént azonosítottak, mely gének kifejeződése a hipoxia stressz kezdete után már 1 órával megemelkedett, majd a stressz folytatódásával fokozatosan visszatért a kiindulási szintre. A gének által kódolt fehérjék közé tartoztak EF-hand motívumot illetve C2-domént tartalmazó fehérjék, a kalmodulin, a calcineurin B-típusú fehérje-fehérje kölcsönható kinázok, valamint egy foszfatidilinozitol 3,4 kináz. Ezek mindegyikének aktivitása Ca^{2+} által szabályozott, vagy képesek a belső raktárhelyekről ionok kiáramoltatásával megváltoztatni a szabad Ca^{2+} koncentrációt a sejtben. Génkifejeződési mintázatuk a kalcium jelátvitelben betöltött szerepükre utal, mely végül a célgén kifejeződésének megváltoztatásához vezet. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az alacsony oxigénszint során bekövetkező stresszválasz magában foglal egy összetett Ca^{2+} -érzékelő és szabályozó hálózatot (Liu és mtsai., 2005). Mivel az AtOxprot gén is hipoxia stressz során nagymértékű, gyors lefutású indukciót mutat, meglehet, hogy a felülszabályozottságához szükséges elsődleges jel szintén a szabad kalcium

koncentrációjának átmeneti emelkedése és/vagy oszcillációja a hipoxia stressz során. Erre vonatkozó kísérletet azonban eddig nem végeztünk.

8.3.4. Az Oxprot fehérje potenciális kölcsönható partnerei

Az AtOXPROT fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok során élesztő kéthibrid rendszerben 18 fehérje kölcsönható partnert sikerült azonosítani. Ezek között 4 gén kifejezetten stresszválaszt nyújtó gén (RD2, ERF4, LOS2, Disease-resistance protein related), s mellettük abiotikus és biotikus ingerekre választ ad még az AUX1 elnevezésű, auxin transzportban szerepet játszó gén is. Az RD2 gén esetében szárazságstressz során figyeltek meg indukciót, a LOS2 gén pedig a hidegtoleranciában játszik szerepet. Az ERF4 gén egy etilén válasz faktor, mely a jázmonsav indukálta védekezési gének negatív regulátora. A „Disease-resistance protein related” gén egy apoptózisban, védekezési válaszban szerepet játszó génhez hasonlatos. Lokalizációjuk igen változatos, némelyikük a sejtmagban fejti ki hatását (ERF4), másikk az endomembrán rendszerben lokalizálódik (Disease-resistance protein related). Van, amelyik az összes sejtszervecskében előfordul (LOS2), s van, ami eddig ismeretlen lokalizációjú (RD2). A fennmaradó gének által kódolt fehérjék változatos biológiai funkciókat töltenek be.

A tény, hogy az AtOXPROT fehérje kölcsönhatásban áll több stresszel is kapcsolatba hozható fehérjével alátámasztja, hogy feltehetően szerepet játszik a különböző stresszekkel szembeni rezisztencia kialakításában.

9. Összefoglalás

A növényi embriogenezis sajátága, hogy nem csak a megtermékenyített petesejtben, de megtermékenyítetlen petesejtben (apomixis), pollen sejtekben (androgenesis) és szomatikus sejtekben (szomatikus embriogenezis) is aktiválódhat az embrió fejlődés genetikai programja. A növényeknek ez a tulajdonsága lehetővé teszi, hogy a különböző embriogén fejlődési utak összehasonlításával általános képet kapjunk az egyedfejlődési totipotencia sejt- és molekuláris biológiai háttéréről és az embriogenezis lefolyását szabályozó sejt szintű folyamatokról.

Laboratóriumunkban a lucerna szomatikus embriogenezisének első lépéseit vizsgáltuk különböző kísérleti megközelítéseket alkalmazva.

A lucerna (*Medicago sativa* L. ssp. *varia*) A2-jelű genotípusát választottuk a szomatikus embriogenezis kezdeti szakaszának vizsgálatára. Korábbi eredmények (Bögre és mtsai. 1990) alapján tudtuk, hogy a lucerna levélprotoplaszt eredetű sejtek különböző fejlődési útvonalat követnek a táptalaj 2,4-diklórfenoxiecetsav (2,4-D) koncentrációjának függvényében. Míg egy viszonylag alacsony 2,4-D koncentráció (1 μ M) hatására a sejtek megnyúlnak és nagy vakuolumot képeznek (nem-embriogén sejt típus, NE), addig 10 μ M 2,4-D jelenlétében a sejtek kicsik, közel gömb alakúak és sűrű citoplazmájúak maradnak (embriogén sejt típus, EM). Ez utóbbi sejt típus képes proembriogén sejt kolóniákká, majd azt követően megfelelő körülmények között szomatikus embriókká fejlődni.

Annak érdekében, hogy az embriogén kompetencia kialakulásakor bekövetkező génexpressziós változásokat feltérképezzük, egy PCR-alapú cDNS kivonási módszer segítségével összehasonlítottuk az EM és NE sejt típusokat első sejtosztódásuk idején (a tenyésztés negyedik napján). Noha a kivonás hatékonysága viszonylag alacsony volt, egy további cDNS szűrési lépést beiktatásával sikerült azonosítani 38 db az embriogén sejtekben a nem embriogén sejtekhez viszonyítva magasabb expressziós szintet mutató cDNS-t.

A cDNS szekvenciáknak megfelelő géneket/fehérjéket a gén-nevezéktani kifejezések segítségével funkcionális kategóriákba soroltuk, s a különböző csoportok egy-egy képviselőjét részletesebb génexpressziós vizsgálatoknak vetettük alá. Valós idejű

PCR segítségével a kiválasztott gének relatív kifejeződését meghatároztuk még 2,4-D-vel kezelt leveleken, valamint a szomatikus embriogenezis teljes folyamata során is. A génkifejeződési mintázatok egy kivételével mind a 11 vizsgált gén esetében alátámasztották a 2,4-D indukáló hatását, beleértve a pozitív kontrollként használt leafy cotyledon1 (MsLEC1) gént is. A jellemzett gének különböző kifejeződési mintázatokat mutattak a szomatikus embriogenezis korai indukciós és a kései embrió differenciálódási szakaszában. A GST-transzferázt, PR10 patogenezishez köthető fehérjét, S3a sejtsztódáshoz köthető riboszomális fehérjét, az ARF-típusú kis GTPáz, valamint a SET nukleosóma-kapcsolt fehérjét kódoló gének magasabb relatív kifejeződést mutattak nem csak a szomatikus embriogenezis kezdeti szakaszában, de a szomatikus embriók differenciálódásának idején is. Mindez arra utalhat, hogy ezek a gének kapcsolatban állnak a szomatikus embriogenezis folyamatának fejlődésbeni átmeneteivel (differenciáció, s dedifferenciáció is).

Az azonosított gének közül kiválasztottunk egy a gyakorlati szempontból ígéretesnek ítélt lucerna cDNS-t, melyet az emberi OXR1 (oxidation resistance) génnel való homológiája alapján Oxprotnak nevezünk el.

Megállapítottuk, hogy a lucerna és lúdfű OXPROT fehérjék képesek komplementálni az *oxr1*_mutáns élesztő törzs hidrogén-peroxid érzékenységét, mely körülbelül tízszerre érzékenyebb, mint a vad típusú törzs.

Emelet a lucerna MsOxprot gén relatív kifejeződése megnő sebzés, szárazság, hőstressz és paraquat kezelés hatására, sejtszuszpénzió esetében vizsgált hipoxia kezelés hatására azonban nem. A fehérjét túltermelő transzformáns lúdfű sejtszuszpénzióban az MsOxprot fehérje mitokondriális lokalizációt mutat. A lúdfű AtOxprot megemelkedett relatív génkifejeződést mutat sebzés, hőstressz, paraquat és hipoxia kezelés hatására, azonban kiszáradás során nem.

Az abiotikus és biotikus stresszfaktorok által aktivált jel és választóvonalak között vannak olyanok, melyek átfednek és így lehetővé teszik a sejtek számára a stressz válaszok koordinálását (Hong-bo és mtsai 2006). Mivel a lucerna és lúdfű Oxprot gének többféle stresszkezelés hatására is képesek indukálódni, ez alkalmassá teheti őket arra, hogy a stresszválaszok során ilyen összehangoló szerepet töltsenek be. Az OXPROT fehérjék jelátviteli szerepére utal az a megfigyelésünk, hogy az Oxprot gének stressz

aktiválása csak átmeneti jellegű, azaz a ROS hosszútávú detoxifikációjában nem vesznek részt.

Fehérje kölcsönható partnerek keresése céljából egy *Arabidopsis* sejtuszuspenzióból készült cDNS-könyvtárat teszteltünk élesztő kettős hibrid rendszerben. 18 kölcsönható partnert sikerült azonosítani, melyek közül 5 gén stresszre illetve abiotikus és biotikus ingerekre ad választ, 7 pedig fehérje és egyéb anyagcsere folyamatokban vesz részt. A fennmaradó gének által kódolt fehérjék változatos biológiai funkciókat töltenek be.

10. Summary

Embryogenesis in plants is not restricted to the fertilized egg cell but can be naturally or artificially induced in many different cell types, like unfertilized eggs (apomixis), pollen cells (androgenesis) and somatic cells (somatic embryogenesis). This ability of plants allows us to compare the different kind of embryogenic developmental pathways, making it possible to have better insight of the cell- and molecular biological background of totipotency and cellular processes controlling embryogenesis.

In our laboratory we examined the first steps of alfalfa somatic embryogenesis applying various experimental approaches.

Alfalfa (*Medicago sativa* L. ssp. *Varia*) A2 genotype was used to examine the initiation of somatic embryogenesis. Previous results (Bögre et al. 1990) revealed that alfalfa leaf protoplast-derived cells follow different developmental pathways depending on the concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the initial culture medium. While a relatively low 2,4-D concentration (1 μ M) results in the formation of elongated vacuolated cells (non-embryogenic cell type, NE), in the presence of 10 μ M 2,4-D cells remain small and spherical with dense cytoplasm (embryogenic cell type, EM). This latter type of cells could develop into proembryogenic cell clusters and sequentially into somatic embryos under appropriate conditions.

In order to reveal gene expression changes during the establishment of embryogenic competence, we compared EM and NE cell types at the time of their first cell divisions (fourth day of culture) using a PCR-based cDNA subtraction approach. Although the subtraction efficiency was relatively low, applying an additional differential screening step allowed the identification of 38 10 μ M 2,4-D up-regulated transcripts. The corresponding genes/proteins were annotated and representatives of various functional groups were selected for more detailed gene expression analysis. Real-time quantitative PCR (RT-QPCR) analysis was used to determine relative expression of the selected genes in 2,4-D-treated leaves as well as during the whole process of somatic embryogenesis. Gene expression patterns confirmed 2,4-D inducibility for all but one of the 11 investigated genes as well as for the positive control leafy cotyledon1 (MsLEC1) gene.

The characterized genes exhibited differential expression patterns during the early induction phase and the late embryo differentiation phase of somatic embryogenesis. Genes coding for a GST-transferase, a PR10 pathogenesis related protein, a cell division-related ribosomal (S3a) protein, an ARF-type small GTPase and the nucleosome assembly factor family SET protein exhibited higher relative expression not only during the induction of somatic embryogenesis but at the time of somatic embryo differentiation as well. This may indicate that the expression of these genes is associated with developmental transitions (differentiation as well as de-differentiation) during the process of somatic embryogenesis.

On the basis of its expression pattern and prosperous function, one of the 38 identified genes was chosen for further characterization. It showed homology to the human oxidation resistance (OXR1) gene with ability to suppress oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, therefore we named it Oxprot.

It was evidenced that alfalfa and *Arabidopsis* OXPROT proteins can complement the peroxide sensitivity of a yeast *oxr1*_ mutant strain, which is approximately 10-fold more sensitive to hydrogen peroxide lethality than is the wildtype strain.

Real-time quantitative PCR (RT-QPCR) analysis was used to determine relative expression of MsOxprot gene under different kind of stress treatments. In the case of whole leaves gene expression was induced by wounding, 37°C heat, drought and paraquat treatments. Hypoxia treatment on alfalfa cell suspension culture failed to induce gene expression. We conducted immunofluorescence experiments on *Arabidopsis* cell suspension culture overexpressing MsOxprot protein, and mitochondrial localization of the mentioned protein was revealed. In the case of *Arabidopsis* AtOxprot gene, relative expression was induced by wounding, 37°C heat and paraquat treatments on whole leaves, and by hypoxia stress treatment on cell suspension culture.

Abiotic as well as biotic stress inducers have some common signaling and response pathways in plants and thereby have the potential to moderate the effect of each other through crosstalking (Hong-bo et al. 2006). As alfalfa and *Arabidopsis* Oxprot genes can be induced by various stress treatments, they are excellent candidates to mediate this stress signaling crosstalk. Especially as we observed that stress induced

activations of the Oxprot genes are transient, and therefore they may rather have a role in signal transduction than in ROS detoxification.

In order to identify Atoxprot interacting protein partners, we screened a cDNA expression library prepared from an *Arabidopsis* cell suspension. 5 of the 18 identified genes showed response to stress, biotic and abiotic stimulus, and 7 played role in protein and other metabolic processes. Proteins coded by remainder genes had diverse biological functions.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segítségemre volt a munkám során, s akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Elsősorban köszönöm főnökömnek, Fehér Attilának, akinek személyében egy rendkívül megértő és segítőkész, valamint nagy tudású embert ismertem meg. Az Ő iránymutatása sokszor átsegített a nehezebb helyzeteken.

Emellett köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak és a csoport asszisztenseinek, akik munkájukkal és ötleteikkel sokszor és sokat segítettek. Szeretném kiemelni Ötvös Krisztina, Bíró Judit, Dunainé Fodor Csilla, Manuela Jurca, Szűcs Attila, Dulguun Dorjgotov, Katona Gyöngyvér, Nagy Róza és Szabó Gáborné nevét.

Ötvös Krisztinának külön köszönöm mély barátságát, s értékes szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom még férjemnek, Rigó Gábornak szeretetért, és hogy soha nem fáradt el a magyarázatok és tanácsok adásában, ha szakmailag szükségem volt rá. A kezdetekben sok buktatótól mentett meg ezáltal.

Végül köszönöm szüleimnek és testvéreimnek mindazt a bizalmat és támogatást, amellyel egész életemben körülvettek és segítettek.

12. Irodalomjegyzék

- **Adachi, Y., Pavlakis, G.N., Copeland, T.D.**(1994) Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia, *J. Biol. Chem.* **269**:2258–2262.
- **Altschul, S.F. , Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* **215** 403–410.
- **Apel, K., and Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:373–399.
- **Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J.** (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses, *Plant Sci.* **172**: 876–887.
- **Araujo, S. D., Duque, A. S. R. L., dos Santos, D. M. M. F., Fevereiro, M. P. S.** (2004) An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **78**:123-131.
- **Avery, A. M., and S. V. Avery.** 2001. Saccharomyces cerevisiae expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **276**:33730–33735.
- **Baudino, S., Hansen, S., Brettschneider, R., Hecht, V. F., Dresselhaus, T., Lorz, H., Dumas, C., Rogowsky, P. M.** (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* **213**:1-10.
- **Blervacq AS, Dubois T, Dubois J, Vasseur J** (1995) First divisions of somatic embryogenic cells in Cichorium hybrid "474". *Protoplasma* **186**:163-168.
- **Blokhina, O.B., Chirkova, T.V., Fagerstedt, K.V.** (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1179–1190.
- **Bögre, L., Stefanov, I., Ábrahám, M., Somogyi, I., Dudits, D.** (1990) Differences in the responses to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment between embryogenic and non-embryogenic lines of alfalfa. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, H. J. J. Nijkamp, L. H. W. van der Plaas, J. Van Aartrijk, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 427-436.
- **Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C. M., van Lammeren, A. A., Miki, B. L., Custers, J. B., Lookeren Campagne, M. M.** (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**:1737-1749.
- **Bowley, S. R., Kielly, G. A., Anandarajah, K., McKersie, B. D., Senaratna, T.** (1993) Field evaluation following two cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis to commercial alfalfa germplasm. *Canad. J. Plant Sci.* **73**:131-137.
- **Brown, D. C. W.** (1988) Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *Hort. Sci.* **23**:526-531.
- **Brown, D. C. W., Atanassov, A.** (1985) Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **4**:111-122.
- **Charrière F, Sotta B, Miginiac É, Hahne G** (1999) Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiol. Biochem.* **37**:751-757.
- **Choi, Y. E., Yang, D. C., Park, J. C., Soh, W. Y., Choi, K. T.** (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Rep.* **17**:544-551.
- **Chuck, G., Hake, S.** (2005) Regulation of developmental transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:67-70.
- **Chugh, A., Khurana, P.** (2002) Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Current Sci.* **83**:715-730.

- **das Neves, L. O., Duque, S. R. L., de Almeida, J. S., Fevereiro, P. S.** (1999) Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn. cv. *Jemalong*. *Plant Cell Rep.* **18**:398-405.
- **de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Dolferus, R.** (1996) Absciscic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **111**(2):381-91
- **de Jong, A. J., Schmidt, E. D., de Vries, S. C.** (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **22**:367-377.
- **de Vries, S. C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H. D., Thomas, T. L., van Kammen, A.** (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* **176**:196-204.
- **Demasi, A. P. D., Pereira, G. A. G., Netto, L. E. S.** (2006) Yeast oxidative stress response, Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS Journal* **273**:805–816
- **Denchev, P. D., Velcheva, M. R., Atanassov, A. I.** (1991) A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Rep.* **10**:338-341.
- **Dong, J. Z., Dunstan, D. I.** (1996) Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* **199**:459-66.
- **Dong, J. Z., Dunstan, D. I.** (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **39**:859-64.
- **Dordas, C., Hasinoff, B.B., Igamberdiev, A.U., Manac'h, N., Rivoal, J., and Hill, R.D.** (2003b). Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J.* **35**, 763–770
- **Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J** (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma* **162**:120-127
- **Dudits, D., Bögre, L., Györgyey, J.** (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Sci.* **99**:475-484.
- **Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., Bakó, L.** (1995) Molecular Biology of Somatic Embryogenesis. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, T. A. Thorpe, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publisher), pp. 267-308.
- **Duque, A. S., Pires, A. S., Dos Santos, D. M., Fevereiro, P.** (2006) Efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from long-term cell suspension cultures of *Medicago truncatula* cv. *Jemalong*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **42**:270-273.
- **Durand, M., Kolpak, A., Farrell, T., Elliott, N.A., Shao, W., Brown, M., Volkert, M.R.** (2007). "The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic oxidation resistance proteins.". *BMC Cell Biol.* **8**: 13.
- **Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ.** (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* (4):555-69.
- **Elliott N.A., Volkert M.R.** (2004) Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol.*; **24**:3180–3187.
- **Fehér, A.** (2006) Why somatic plant cells start to form embryos? in: J. Samaj, A. Mujib (ed.), *Plant Cell Monographs*, vol. 2, Springer, Berlin/Heidelberg, , pp. 85–101.
- **Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D.** (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **74**:201-228.
- **Fehér, A., Pasternak, T., Ötvös, K., Dudits D** (2005) Plant protoplasts: Consequences of lost cell walls. In: *Journey of a Single Cell to a Plant*, S. J. Murch és P. K. Saxena, szerk. (Enfield, NH, USA: Science Publishers, Inc.), pp. 59-90.
- **Feliciello, I., Chinali, G.** (1993) A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **212**:394-401.
- **Ferrando, A., Farrás, R., Jásik, J., Schell, J. and Koncz, C.** (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J* **22**: 553-560.

- **Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., von Arnold, S.** (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* **51**:249-264.
- **Fischer, H., X. U. Zhang, K. P. O'Brien, P. Kylsten, and E. Engvall.** (2001.) C7, a novel nucleolar protein, is the mouse homologue of the *Drosophila* late puff product L82 and an isoform of human OXR1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**:795–803.
- **Fowler, M. R., Ong, L. M., Russinova, E., Atanassov, A. I., Scott, N. W., Slater, A., Elliott, M. C.** (1998) Early changes in gene expression during direct somatic embryogenesis in alfalfa revealed by RAP-PCR. *J. Exp. Bot.* **49**:249-253.
- **Fujimura, T. és Komamine, A.** (1975) Effects of various growth regulators on embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.* **5**:359-364.
- **Fülöp, K., Pettkő-Szandtner, A., Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, E., Dudits, D., Bakó, L.** (2005) The *Medicago* CDKC1;1-CYCLINT1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J.* **42**:810-820.
- **Gaj, M. D., Zhang, S. B., Harada, J. J., Lemaux, P. G.** (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* **222**:977-988
- **Galland, R., Randoux, B., Vasseur, J., Hilbert, J.L.** (2001) A glutathione S-transferase cDNA identified by mRNA differential display is upregulated during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1522** 212–216.
- **Gebbie, L.K., Burn, J.E., Hocart, C.H., Williamson, R.E.** (2005) Genes encoding ADP-ribosylation factors in *Arabidopsis thaliana* L. Heyn.; genome analysis and antisense suppression, *J. Exp. Bot.* **56** 1079–1091.
- **Geldner, J. N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jurgens, G.** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-independent plant growth, *Cell* **112** 219–230.
- **Giroux, R. W., Pauls, K. P.** (1997) Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **33**:393-404.
- **Grant, C. M., G. Perrone, and I. W. Dawes.**(1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**:893–898.
- **Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., Dudits, D.** (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**:999-1007.
- **Györgyey, J., Németh, K., Magyar, Z., Kelemen, Z., Alliotte, T., Inze, D., Dudits, D.** (1997) Expression of a novel-type small proline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells. *Plant Mol. Biol.* **34**:593-602.
- **Halperin W** (1995) *In Vitro* Embryogenesis: Some Historical Issues and Unresolved Problems. In: *In Vitro* Embryogenesis in Plants, Thorpe TA, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 1.-17.
- **Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, S. C.** (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* **127**:803-816.
- **Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., Hilbert, J. L.** (1998) Extracellular beta-1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta* **205**:56-63.
- **Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inze, D., Vasseur, J., Hilbert, J. L.** (2000b) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J. Exp. Bot.* **51**:1189-1200.
- **Hendriks, T., Scheer, I., Quillet, M. C., Randoux, B., Delbreil, B., Vasseur, J., Hilbert, J. L.** (1998) A nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**:193-197.
- **Hita, O., Lafarga, C., Guerra, H.** (1997) Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietinum* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* **19**:333-338.

- **Hong-bo, S., Li-ye, C., Chang-xing, Z., Qing-jie, G., Xian-an, L., Jean-Marcel, R.** (2006) Plant Gene Regulatory Network System Under Abiotic Stress, *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 50(1-2):1-9
- **Hu, H., Xiong, L., Yang, Y.** (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**:107-117.
- **Huang, L., Franklin, A. E., Hoffman, N. E.** (1993) Primary structure and characterization of an *Arabidopsis thaliana* calnexin-like protein. *J. Biol. Chem.* **268**:6560-6566.
- **Iantcheva, A., Vlahova, M., Atanasov, A.** (2006) Somatic embryogenesis in genera *Medicago*: an overview. In: *Somatic Embryogenesis*, A. Mujid és J. Samaj, szerk. (Berlin: Springer), pp. 285-304
- **Iantcheva, A., Vlahova, M., Trinh, T. H., Brown, S. C., Slater, A., Elliot, M. C., Atanasov, A.** (2001) Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual *Medicago*. *Plant Sci.* **160**:621-627.
- **Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., Kamada, H.** (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **34**:107-114.
- **Imin, N., De Jong, F., Mathesius, U., van Noorden, G., Saeed, N.A., Wang, X.-D., Rose, R.J., Rolfe, B.G.** (2004) Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts, *Proteomics* **4** 1883–1896.
- **Imin, N., Nizamidin, M., Daniher, D., Nolan, K. E., Rose, R. J., Rolfe, B. G.** (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-Benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol.* **137**:1250-1260.
- **Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Atanasov, A., Van Onckelen, H.** (1994) Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiol. Plant.* **92**:85-89.
- **Jimenez, V. M.** (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* **47**:91-110.
- **Jimenez, V. M., Bangerth, F.** (2001a) Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **67**:37-46.
- **Jimenez, V. M., Bangerth, F.** (2001b) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol. Plant.* **111**:389-395.
- **Jimenez, V. M., Bangerth, F.** (2001c) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci.* **160**:247-257.
- **Jimenez, V. M., Thomas, C.** (2006) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: *Somatic Embryogenesis*, A. Mujid és J. Samaj, szerk. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 103-118.
- **Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue T, Harada H** (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **25**:1163-1168
- **Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H., Harada, H.** (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Cult. Lett.* **10**:38-44.
- **Kao, K.N.; Michayluk, M.R.** (1980). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v.96, p.135-141.
- **Kielly, G. A. és Bowley, S. R.** (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* **35**:474-477.
- **Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., Nagata, T.** (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep.* **19**:551-557.
- **Kiyosue T, Takano K, Kamada H, Harada H** (1990) Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Canad. J. Bot.* **68**:2301.
- **Koltunow, A. M., Grossniklaus, U.** (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**:547-574.
- **Krishna Raj, S., Vasil, I. K.** (2006) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, T. A. Thorpe, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 417-470

- **Lin, X., Hwang, G. J., Zimmerman, J. L.** (1996) Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant Physiol.* **112**:1365-1374.
- **Liu, F., VanToai, T., Moy, L. P., Bock, G., Linford, L. D. and Quackenbush, J.** (2005) Global Transcription Profiling Reveals Comprehensive Insights into Hypoxic Response in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, Vol. 137, pp. 1115–1129,
- **Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. L., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J.** (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**:1195-1205
- **Mashayekhi, K., Neumann, K.H.,** 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **84**, 279–283.
- **Michalczuk L, Cooke TJ, Cohen JD** (1992a) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* **31**:1097-1103.
- **Michalczuk L, Ribnitzky DM, Cooke TJ, Cohen JD** (1992b) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* **100**:1346-1353.
- **Michalczuk, L., Druart, P.** (1999) Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil (R) cherry rootstock (*Prunus incisa x serrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, nonembryogenic calli of *Prunus incisa x serrula* and *Prunus domestica*. *Physiol. Plant.* **107**:426-432.
- **Mitsubishi, W., Toyomasu, T., Masui, H., Katho, T., Nakaminami, K., Kashiwagi, Y., Akutsu, M., Kenmoku, H., Sassa, T., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Kamada, H.** (2003) Gibberellin is essentially required for carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis: Dynamic regulation of gibberellin 3-oxidase gene expressions. *Biosci. Biotech. Biochem.* **67**:2438-2447.
- **Møller, I.M.** (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 561–591.
- **Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gomez, M. C., Paleo, A. H. D., Diaz, D. G., Rios, R. D., Franzone, P. M.** (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **77**:119-124.
- **Mordhorst, A. P., Voerman, K. J., Hartog, M. V., Meijer, E. A., van Went, J., Koornneef, M., de Vries, S. C.** (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* **149**:549-563.
- **Naora, H.** (1999) Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity? *Immunol. Cell Biol.* **77** 197–205.
- **Natoli R, Provis J, Valter K, Stone J.** (2008) Expression and role of the early-response gene *Oxr1* in the hyperoxia-challenged mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **49**(10):4561-7
- **Neumann, K. H.** (2000). Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>
- **Nishiwaki, M., Fujino, K., Koda, Y., Masuda, K., Kikuta, Y.** (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* **211**:756-759.
- **Nolan, K. E., Irwanto, R. R., Rose, R. J.** (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* **133**:218-230.
- **Nolan, K. E., Rose, R. J., Gorst, J. R.** (1989) Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture - Increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Rep.* **8**:278-281.
- **Nomura K, Komamine A** (1995) Physiological and biological aspects of somatic embryogenesis. In: *In vitro* Embryogenesis in Plants, Thorpe TA, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 249-266.
- **Nomura, K., Komamine, A.** (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* **79**:988-991.
- **Nomura, K., Komamine, A.** (2005) Somatic embryogenesis in carrot suspension cultures as a model for expression of totipotency. In: *Journey of a Single Cell to a Plant*, S. J. Murch és P. K. Saxena, szerk. (Enfield, NH, USA: Science Publishers, Inc.), pp. 227-248.

- Nowak, S. J., Pai, C. Y., Corces, V. G. (2003) Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **23**:6129-6138.
- Ötvös, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szűcs, A., Bottka, S., Dudits, D., Fehér, A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* **43**:849-860
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C., Paek, K.H. (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway, *Plant J.* **37** 186–198.
- Pasternak, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Mészáros, T., Dudits, D., Fehér, A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regul.* **32**:129-141.
- Pasternak, T., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H., Dudits, D., Fehér, A. (2002) The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **129**:1807-1819.
- Pasternak, T.P., Rudas, V.A., Kumlehn, J., Lörz, H. (1999) High efficiency plant regeneration from barley leaf tissues, *J. Plant Physiol.* **155** 371–375.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N. and Flagella Z. (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, **58**:195–210
- Pennell, R. I., Janniche, L., Scofield, G. N., Booij, H., de Vries, S. C., Roberts, K. (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell Biol.* **119**:1371-1380.
- Perry, S. E., Nichols, K. W., Fernandez, D. E. (1996) The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *Plant Cell* **8**:1977-1989.
- Praekelt, U. M., and P. A. Meacock. (1990). HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* **223**:97–106.
- Rajapakse, N., Butterworth, M., Kortenkamp, A.: (2005) Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites. *Environ Mol Mutagen*, **45**(4):397-404
- Rajasekaran, K., Hein, M. B., Davis, G. C., Carnes, M. G., Vasil, I. K. (1987) Exogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J. Plant Phys.* **130**:13-25.
- Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B. & Demple, B. (1991) Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase, repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4537–4544.
- Randoux, B., Quillet, M.C., Rambaud, C., Vasseur, J. , Hilbert, J.L. (2002) Characterisation of cDNAs homologous to Rab5-GTP binding protein expressed during early somatic embryogenesis in chicory, *Plant Sci.* **162**: 413–422.
- Reinert, J. (1958) Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften* **45**:344-345.
- Rensing, S. A., Lang, D., Schumann, E., Reski, R., Hohe, A. (2005) EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. *J. Plant Growth Regul.* **24**:102-115.
- Ribnicky, D.M., Cohen, J.D., Hu, W.S., Cooke, T.J. (2001) An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. *Planta.* **214**:505–509
- Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., Gomez, M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., del Rio, L. A., Palma, J. M. (2004) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Environ.* **27**:1135-1148.
- Rudus, I., Kepczynska, E., Kepczynski, J. (2002) Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul.* **36**:91-95.

- **Rutherford, S., Moore, I.** (2002) The *Arabidopsis* Rab GTPase family: another enigma variation, *Curr. Opin. Plant Biol.* **5** 518–528.
- **S. Hong-bo, C. Li-ye, Z. Chang-xing, G. Qing-jie, L. Xian-an, R. Jean-Marcel** (2006) Plant Gene Regulatory Network System Under Abiotic Stress, *Acta Biologica Szegediensis*, **50**(1-2):1-9
- **Sagare, A. P., Lee, Y. L., Lin, T. C., Chen, C. C., Tsay, H. S.** (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - a medicinal plant. *Plant Sci.* **160**:139-147.
- **Samaj, J., Baluska, F., Pretova, A., Volkmann, D.** (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeletal arrays. *Plant Cell Rep.* **21**:940-945.
- **Sambrook, J., MacCallum, P., Russell, D.** (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- **Sanders, J., Bingham, E. T.** (1972) Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* **12**:804-808.
- **Sato, S., Toya, T., Kawahara, R., Whittier, R. F., Fukuda, H., Komamine, A.** (1995) Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **28**:39-46.
- **Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., de Vries, S. C.** (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**:2049-2062.
- **Schoffl, F., Prandl, R., Reindl, A.** (1998) Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* **117**:1135-1141.
- **Senger, S., Mock, H. P., Conrad, U., Manteuffel, R.** (2001) Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. *Plant Cell Rep.* **20**:112-120.
- **Sheen, J.** (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts, *Plant Physiol.* **127** 1466–1475.
- **Somleva, M. N., Schmidt, E. D. L., de Vries, S. C.** (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* **19**:718-726.
- **Sterk, P., Booi, H., Schellekens, G. A., van Kammen, A., de Vries, S. C.** (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**:907-921.
- **Steward, F. C., Mapes, M. O., Mears, K.** (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* **45**:705-708.
- **Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J.** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:11806-11811
- **Stowers, R. S., S. Russell, and D. Garza.** (1999). The 82F late puff contains the L82 gene, an essential member of a novel gene family. *Dev. Biol.* **213**:116–130.
- **Szücs, A., Dorjgotov, D., Otvos, K., Fodor, C., Domoki, M., Györgyey, J., Kaló, P., Kiss, G. B., Dudits, D., Fehér, A.** (2006) Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Exp.* **1759**:108-115.
- **Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J., Millar, A.H.** (2002) The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *The Plant Journal* **32** 891–904
- **Taylor, R. L.** (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Can. J. Bot.* **45**:1553-1556
- **Taylor, N.L. and Millar, A.H.** (2007) Oxidative Stress and Plant Mitochondria. Book Title: Mitochondria: Practical Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol: **372**. Page Range: 389-403
- **Thibaud-Nissen, F. O., Shealy, R. T., Khanna, A., Vodkin, L. O.** (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol.* **132**:118-136.
- **Thomas, C., Bronner, R., Molinier, J., Prinsen, E., Van Onckelen, H., Hahne, G.** (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta* **215**:577-583.

- **Thorpe TA** (1995) *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- **Tokuji, Y., Kuriyama, K.** (2003) Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). J. Plant Phys. **160**:133-141.
- **Toonen, M. A. J., Hendriks, T., Schmidt, E. D. L., Verhoeven, H. A., van Kammen, A., de Vries, S. C.** (1994) Description of somatic-embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta **194**:565-572.
- **Trevaskis, B., Watts, R.A., Andersson, C.R., Llewellyn, D.J., Hargrove, M.S., Olson, J.S., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (1997). Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: The evolutionary origins of leghemoglobins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 12230–12234
- **van den Berg C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., Scheres, B.** (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. Nature **378**:62-65.
- **van den Berg C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. Nature **390**:287-289.
- **Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z.B., Nielsen, E.** (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*, Plant Physiol. **131** 1191–1208.
- **Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inze, D., May, M. J., Sung, Z. R.** (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. Plant Cell **12**:97-110.
- **Volkert, M.R., Elliott, N.A., Housman, D.E.** (2000) Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97** 14530–14535.
- **Xu, N. F., Bewley, J. D.** (1992) Contrasting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfalfa (*Medicago sativa* L) as revealed by scanning electron microscopy. Plant Cell Rep. **11**:279-284.
- **Yarbrough, J. A.** (1932) Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calycinum*. Am. J. Bot. **19**:443-453.
- **Yasuda, H., Nakajima, M., Ito, T., Ohwada, T., Masuda, H.** (2001) Partial characterization of genes whose transcripts accumulate preferentially in cell clusters at the earliest stage of carrot somatic embryogenesis. Plant Mol. Biol. **45**:705-712.
- **Yazawa, K., Takahata, K., Kamada, H.** (2004) Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. Plant Physiol. Biochem. **42**:215-223
- **Yeung EC** (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *In vitro* Embryogenesis in Plants, Thorpe TA, szerk. (Dordrecht: Kluwer Academic Publisher), pp. 205-248.
- **Zimmerman, J. L.** (1993) Somatic embryogenesis. Plant Cell **5**:1411-1423.
- **Zuo, J., Niu, Q. W., Frugis, G., Chua, N. H.** (2002) The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. Plant J. **30**:349-359.

13. Függelék

Node	Answer	View	Substring	Value(s)	Plot
1. Signal peptide?	No	Average Hydropathy (KYTJ820101)	[6,25]	-0.81 (>= 0.9225? No)	show
2. Mitochondrial or chloroplast ?	Yes	Average Negative Charge (FAUJ880112)	[1,30]	0.0666667 (< 0.083? Yes)	show
		Indexing: AII Pattern: 22121222 (ins/del <= 2)	[1,30]	MGNAQSPPTDPRYLSA-SRAFTQKGLNLKS 2002222220212222-21222200200202 22121222	--

13-1. Ábra: Az *MsOxprot* gén fehérjeszekvenciája alapján készült predikció

TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Using NON-PLANT networks.

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
oxprot1At_At5g06260_	424	0.617	0.066	0.327	M	4	21
cutoff		0.000	0.000	0.000			

Using PLANT networks.

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
oxprot1At_At5g06260_	424	0.414	0.162	0.124	0.426	_	5	-
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

13-2. Ábra: Az *At5g06260* gén fehérjeszekvenciája alapján készült predikció. mTP:mitokondriális lokalizáció valószínűsége, cTP: kloroplasztisz lokalizáció valószínűsége