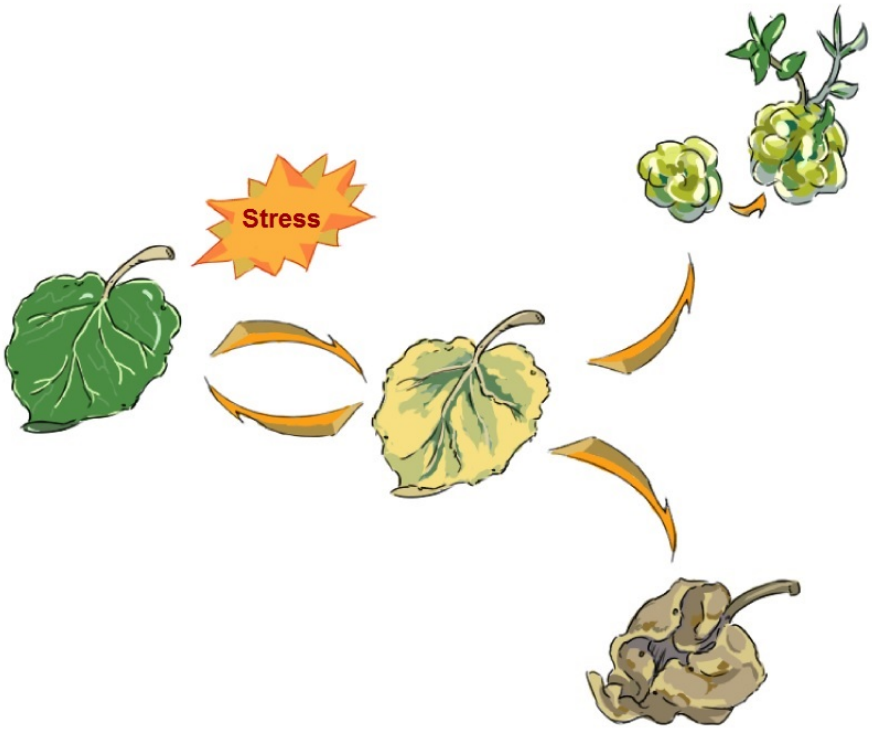
UPPSALA
UNIVERSITET

Stress som en direkt inverkan på dedifferentiering i somatiska växtceller



Ida Brisvåg Perman

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Stress som en direkt inverkan på dedifferens i somatiska växtceller

Ida Brisvåg Perman

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Växters celler har stor förmåga att ändra form eller egenskaper utan att ändra sina gener. Ett extremt exempel på detta är dedifferentiering. Det är processen när en mogen cell monterar ner specialiserade strukturer och återfår stamcellsförmågan att kunna utvecklas till en helt annan typ av cell. Fenomenet har studerats på växtceller utan cellvägg, protoplaster, som i kontrollerad laboratoriemiljö kan bilda en stamcellslik cellmassa och utveckla ny vävnad. Mindre studerat är hur denna förmåga används i naturen och vad som får den att ske. Kunskap om hur dedifferentiering kan styras och hur växter reagerar på hot och stress är viktigt inom exempelvis jordbruk, växtmodifiering och som modell inom medicinen. Denna uppsatts handlar om ifall stressfaktorer, som torka eller mörker, kan få en vuxen cell att genomgå dedifferentiering. Utgångspunkten är ifall protoplaster är en bra modell för att studera dedifferentierande celler, och om det finns likheter mellan dessa och stressade växtceller. Under vissa typer av stress, särskilt mörker, kan celler genomgå senescens. Det är del av cellens livscykel som i många fall innebär det att cellen töms på näring och dör under ordnade former. Fenomenet har många likheter med både stress och dedifferentiering och den tredje utgångspunkten är ifall denna process kan vara ett exempel på stressinducerad dedifferentiering.

Litteraturstudien visar att protoplaster reglerar sina gener på ett sätt som påminner om en stamcells, samt bryter ner vissa strukturer. Även celler under stress uppvisar en tydlig tendens till samma typ av genreglering. Detsamma gäller senescerande celler i vilka strukturell nedmontering sker, samtidigt som genregleringen liknar den hos protoplaster. Vissa transkriptionsfaktorer kunde ses i celler under stress, protoplaster, senescerande celler och celler med stamcellsegenskaper men ej i mogna celler. Särskilt tydligt samband fanns mellan protoplaster och senescerande celler.

Slutledningen är att protoplaster tycks fungera väl som modell för dedifferentiering. Jämfört med stressade celler fanns många likheter, särskilt inom genreglering och med vissa proteiner. Dock kunde inte materialet tydligt visa att stressade celler förlorade sin specialiserade struktur. Däremot tycktes sambandet mellan senescerande celler och dedifferentierande celler starkt. Stressinducerad förtida senescens celler kan möjligen ses som ett exempel på dedifferentiering som en direkt följd av stressrespons.

Inledning

Två faktorer har haft stort inflytande över växters utveckling och lett till evolutionära anpassningar som skiljer dem från många djur. Den ena är förmågan att konvertera ljus till kemisk energi, fotosyntes. Den andra är att växter förblir på samma plats under större delen av sitt liv, att de är sessila organismer. Detta innebär att angrepp från herbivorer och patogener inte kan undflys och att brist på ljus, vatten eller näring inte kan lösas med ett miljöombyte. Detta är ett av de viktigare skälen till att växter uppvisar en långt högre plasticitet än de flesta djur. Plasticitet innebär förmågan att ändra sin fenotyp utan att påverka genotypen. Besläktade individer kan på så vis uppvisa stora skillnader i fysiologi beroende på livsmiljö. En extrem anpassning kan ses i cellers förmåga att återfå stamcellsliknande egenskaper efter att den mognat klart (Beck 2008).

Under de allra tidigaste ögonblicken i organismens liv, det embryotiska stadiet, genereras pluripotenta stamceller. Dessa är celler med potentialen att utvecklas till en mängd olika specialiserade celltyper. Stamceller återfinns även i vuxna djur och växter, då i specialiserade nischer

där de är skyddade men också tillgängliga. I växter hittas de i olika typer av meristem, zoner där nya stamceller bildas, främst i rot- och skottspettsar. Utifrån dessa avsätts nya celler att bilda olika vävnadstyper som kan påverka växtens tillväxt, skadeläkning och organbildning (Beck 2008).
När en pluripotent cell specialiseras och får en särskild arbetsuppgift, exempelvis fotosyntes i en mesofyllcell, förlorar den även pluripotensen. En sådan cell har differentierats och blivit en så kallad somatisk cell (Beck 2008). Man har länge vetat att många differentierade celler kan återgå till ett stadium där de återfår pluripotens och kan omprogrammeras. Detta sker även i djur, men är långt mer tillgängligt och effektivt i växter. Det är denna förmåga som gör det möjligt att ta sticklingar från växter. En avklippt stam kan under gynnsamma förhållanden utveckla rötter genom att celler i stammen dedifferentierar, återgår till ett helt eller mer odifferentierat stadium med viss pluripotens, och omprogrammeras till rotceller. Det har bevisats att vilken växtcell som helst, vars differentiering inte lett till programmerad celldöd, kan ge upphov till en helt ny planta i en process som kallas somatisk embryogenes (Steward *et al.* 1958).
Växters plasticitet uppkommer som en respons på sin omgivning, utifrån vilka stressfaktorer som verkar på växten. Exempelvis torka leder till att mer avancerade rötter utvecklas och på en vindpinad plats gynnas individen av att endast utveckla en kort stam. Det är därmed tydligt att stress har någon form av inverkan på organismen. Cellens förmåga att dedifferentiera har studerats flitigt under *in vitro* förhållanden där olika växtceller kan fås att bilda nya typer av vävnader. Det har länge utgåtts från att stress kan leda till omprogrammering av somatiska celler till meristemceller, men få studier har gjorts för att fastställa ett direkt samband mellan stressrespons och dedifferentiering. Trots detta är den egenskapen central i en rad applikationer: Mirkopropagering där plantor klonas *in vitro* från dedifferentierande celler vilket ger många plantor utan traditionell befruktning (Paek *et al.* 2001), bevarandet av växtgenetiska resurser samt framställandet av genetiskt modifierade grödor (Grafi & Barak 2015).
Med en globalt växande befolkningsmängd som förväntas nå över nio miljarder år 2050 följer en ökad efterfråga på större matproduktion. Samtidigt har det visat sig svårt att utöka andelen odlingsbar mark till följd av flera faktorer. Urbanisering, erodering och ökenutbredning konkurrerar om utrymme samtidigt som det finns en vilja att bevara biotoper med biologiskt mångfald. För att kunna producera mer mat med samma odlingsyta krävs därför en effektivisering av jordbruket (översiktligt Golldack *et al.* 2011). Olika typer av stress, såsom herbivorer, patogener och framför allt tork- och saltstress ses som det största problemet för global agrikultur (Zhu 2002). Därför har behovet att förstå mekanismen för hur detta regleras i olika växter varit stort. Växters effektivitet vid omprogrammering av somatiska celler ligger till grund för organismens potential till lång livslängd, individuell anpassning till miljöfaktorer och starka regenerativa förmåga. Effekterna av stress vid dedifferentiering är därmed viktig att kartlägga för anpassandet av jordbruket och modifiering av stresståligare grödor.
Inom stamcellsforskningen har växter använts som modell för att förstå dedifferentiering då djurcellers förmåga till dedifferentiering är långt mindre effektiv. Den regenerativa potentialen från återtagen pluripotens är av stort medicinskt intresse (översiktligt Xiao *et al.* 2012). Cellens förmåga att dedifferentiera har studerats flitigt under *in vitro* förhållanden, men få studier har gjorts för att kartlägga om stress kan ha en direkt inverkan på responsen som leder till dedifferentiering av en somatisk cell.

Frågeställning

Det här arbetet syftar till att utreda kopplingar mellan celler i ett tillstånd av stress och celler i ett tillstånd av dedifferentiering. Jag vill undersöka om stress är en faktor som direkt påverkar mekanismer som leder till övergången från somatisk cell till pluripotent cell. Detta kommer ske utifrån tre frågeställningar:
Om protoplaster kan användas som en modell för dedifferentierande celler. Många undersökningar väljer att jämföra protoplaster med celler under stress då protoplaster har egenskaper

som tycks överensstämma med dedifferentierande celler. Jag vill kartlägga om det finns grunder för det antagandet.
Om det finns ett sammanhang mellan celler under stress, celler under dedifferentiering och celler som genomgår senescens. Senescens är en reglerad process som appliceras vid exempelvis bladfällning eller fruktmognad. Det innebär ofta en uttransport av näringsämnen ur cellen följt av en programmerad celldöd, antingen som en del av organismens livscykel eller som en respons till stress. Senare studier har visat på en koppling mellan senescens och dedifferentiering och särskilt fokus kommer läggas för att utreda om detta tillstånd kan ses som ett bevis för stressinducerad dedifferentiering.
Om det finns likheter mellan celler som genomgår dedifferentiering och celler under stress. Detta skulle innebära att en cells respons till stress följer en liknande reaktionsväg som en dedifferentierande cell.

Dedifferentiering

1959 diskuterade Elizabeth Hay debatten kring definitionen av termen dedifferentiering. Det fanns en vilja att reservera termen för celler som uppnått ett embryoliknande stadium genom ”strukturell förenkling”, eller förlust av specialisering och funktion, samt återskapad pluripotens. Det vill säga förmågan att specialiseras till ett antal olika celltyper. Problemet var då att pluripotens med tidigare teknik varit svårt att observera. Därmed var det svårt att bevisa dess närvaro eller frånvaro i vart fall och att det fanns en tendens att använda ordet dedifferentiering för alla celler som gick igenom en förenkling. I experimentet som föregicks av denna översikt lät Hay studera återbildandet av amputerad lem hos larver från gulfläckig mullvadssalamander (*Ambystoma maculatum*) under elektronmikroskop. I och med denna nya teknik kunde Hay observera en despecialisering av muskelceller. Fragment av mikrofibriller bröts ner, det endoplasmatiska nätverket (ER) bröts upp till små vesiklar och Hay observerade en ökning av ribonukleoprotein-granula. Dessa granula finns karakteristiskt i odifferentierade celler, det vill säga celler med stamcellspotential, samt i däggdjursceller under stress (Moser & Fritzler 2010). Hay kunde även observera förändringar i cellkärnan, bland annat en lösare kromatinstruktur vilket underlättar åtkomsten av gener, och en tydligare nukleol. Cellen hade därmed återgått till ett embryoliknande stadium eftersom strukturen förlorat specialiserade karaktärsdrag samt uppnått en genåtkomst som tillåter pluripotens. Hay sammanfattade observationerna med att dessa egenskaper gav cellen förmågan att snabbt kunna bygga upp en stor cellmassa och omprogrammeras för att bilda ny typ av vävnad och bygga upp en ny lem. En cell kan därför ses som dedifferentierad om den har förmågan att bli någonting annat än celltypen den härstammade från. Detta experiment hänvisade till dedifferentieringen i djurceller, men samma kriterium gäller för växtceller (Hay 1959).

Dedifferentiering i vardagen

För växter är dedifferentiering en viktig och vanlig del i organismens liv. Redan tidigare har nämnts hur denna faktor påverkar organismens plasticitet. Fenomenet är inblandat vid regenerering av förlorad vävnad, vid återbildandet av en levande individ från separerade växtdelar, men även i växtens etablerade tillväxtprogram. Celler i växter som bygger upp periderm från det sekundära meristemet utgår från detta (Beck 2005). Periderm är det yttersta lagret på växtdelar som inte längre har epidermis och kallas ofta för bark. Det sekundära meristemet, även kallat korkkambium eller fellogen, skiljer sig från övriga meristem i att det inte ursprungligen består av odifferentierade celler. Istället utvecklas fellogen från parenkymceller som dedifferentierar till korkkambium som i sin tur ger upphov till peridermceller (Beck 2005). En cell har återfått pluripotens och gett upphov till en celltyp annan än ursprunget.

Somatisk embryogenes
Det extrema exemplet på dedifferentiering är växters förmåga till somatisk embryogenes. Tidigare har detta trots vara en egenskap enbart förekommande hos växtceller, men nyligen har experiment lyckats bilda pluripotenta stamceller i möss och människa med hjälp av konstgjorda transkriptionsfaktorer (Xiao *et al.* 2012). Somatisk embryogenes behandlar hur en mogen cell kan återgå till ett äkta embryogenetiskt stadium, det vill säga ge upphov till alla celler i en helt ny individ. Detta har studerats flitigt under många år, redan år 1958 kunde en hel individ utvecklas *in vitro* från enstaka morotsceller (*Daucus carota sativus*) (Steward *et al.* 1958). Under *in vitro* studier kan det följas hur en cell omprogrammeras och hur utvecklingen styrs av hormoner. Detta har också demonstrerats med bladceller från *Petunia hybrida* (hybrid av petunia). Under kultiveringen används protoplaster, celler utan cellvägg, som tillåts växa i ett flytande odlingsmedium. Cellerna återfår cellvägg, delas och bildar en typ av ”ärrvävnad” kallad kallus, kolonier av odifferentierade celler. Vid skadad vävnad bildar ofta växter kallus kring såret så att ny vävnad kan avsättas. Genom tillsatts av olika koncentrationer av växthormonerna auxin och cytokinin kan *in vitro* kallus fås att utveckla rötter respektive skott och bilda en ny planta (Frearson *et al*. 1973).
Detta ger en definition för dedifferentiering samt en översikt över när och var den inträffar. För att söka efter dedifferentierande celler, eller celler med liknande egenskaper, söks ofta efter genreglerande proteiner kopplade till tillståndet (Chen & Chen 2000, Florentin *et al.* 2013). Dessa kan kvantifieras och analyseras och är därför ett praktiskt verktyg. Men för att förstå vilka proteiner som är involverade, krävs att vi förstår hur dedifferentierade celler reglerar sina gener.

Kromatinstruktur och modifieringar i stamcellsliknande celler

Dedifferentierade celler definieras genom processen där de återfår en stamcellsliknande struktur och pluripotens. Mycket pekar på att denna förmåga är kopplad till en så kallad öppen kromatinstruktur. Stamcellers transkriptom, vilka gener som är aktiva och till vilken grad, har studerats mycket det senaste decenniet och idén har presenterats att stamceller inte bör identifieras som är en särskild celltyp utan snarare är en cell som uttrycker en viss typ av gener och har en viss typ av kromatinstruktur (Meshorer & Misteli 2006, Grafi & Barak 2015).
Kromatin är den struktur som bygger upp kromosomerna. Det består av ett band av nukleosomer, DNA strängar upplindade på en särskilt typ av proteiner som kallas histoner. Kromatin delas upp i två typer, hetero- eller eukromatin, beroende på hur tätt histonerna binder DNA strängarna. Eukromatin har i förhållande mindre kondenserad struktur med en lösare formation av histoner som gör genåtkomsten lättare. Heterokromatin har kondenserad struktur där histonerna bildar en tätare formation vilket skyddar generna från mutationer och andra skador men gör dem även otillgängliga för interaktioner. Generna kan exempelvis inte transkriberas, rekombineras eller replikeras. De är i den strukturen inaktiverade, eller ”tystade” (Hartwell *et al* 2008). Det är tydligt att jämfört med somatiska celler har stamceller en långt mer ”öppen” kromatinstruktur, med en större andel eukromatin än heterokromatin. Detta är en av flera vitala faktorer för att initiera transkription och differentiering (Gaspar-Maia *et al.* 2011).
Kromatinproteiner är starkt bevarade och samma strukturer återfinns i såväl djur, växter och svampar (översiktligt av Meyerowitz 2002). Regleringen av genuttryck via kromatinstruktur sker då med liknande mekanismer över rikena, även om dessa mekanismer kan användas på olika sätt (Jerzmanowski 2007). Därmed är det rimligt med exempel från både djurceller och växtceller vid resonemang kring kromatinstrukturer.

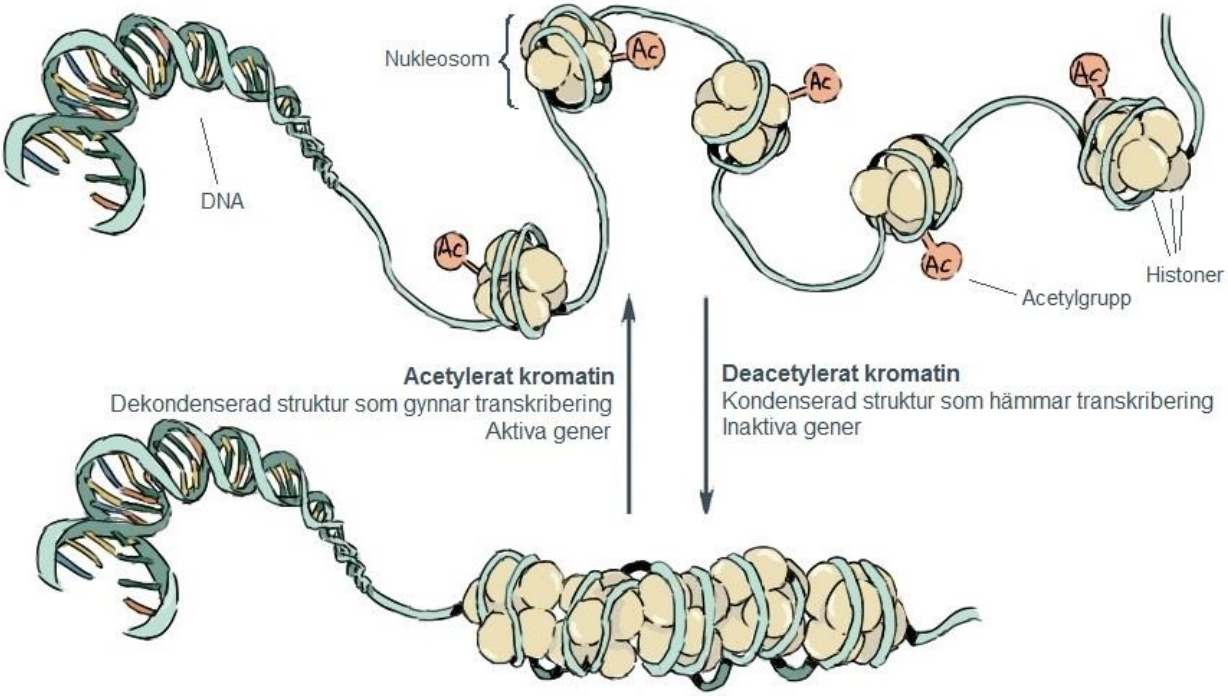
Histoner och modifiering av kromatinstruktur

Modifiering av histoner är en epigenetisk process, en process där genuttrycket påverkas utan att ändra på generna i fråga, och resulterar i förändringar i kromatinstruktur (översiktligt Luo *et al.* 2012).

I varje nukleosom ingår ett antal olika histoner, starkt positiva basiska proteiner vilket gör att de lätt binder till de negativt laddade fosforbryggorna i DNA. Fyra grupper är starkt bevarade inom eukaryoter och är de som i huvudsak är inblandade i uppbyggandet av nukleosomer. De kallas kärnhistoner och av dessa är grupperna H3 och H4 särskilt inblandade vid reglering av kromatinstruktur.

Histoner är utrustade med sidokedjor som kan utsättas för olika typer av reversibel kemisk modifiering, vilket kan påverka nukleosomstrukturen. Till dessa modifieringar hör interaktionen med olika funktionella grupper. I denna rapport kommer fokus främst ligga på modifieringarna acetylering, som ofta ger en öppen kromatinstruktur, och metylering, som ofta ger en stängd men även kan bidra till en öppen konformation (Arents & Moudrianakis 1995, Hartwell *et al.* 2008).

Acetylerade histoner har visat sig vara inblandade i dekondensering av kromatin. Dessa har observerats öka markant vid aktivt transkriberande av gener eller dess promotor, en DNA sekvens som inleder transkriptionen av själva genen. Samtidigt som deacetylering är en bidragande faktor till kondensering och tystande av genuttryck. Därför kan andelen acetylerade histoner fungera som markörer när man ska bedöma genaktivitet (Casati *et al.* 2008, Earley *et al.* 2006) (figur 1).



Figur 1. Illustrering av dekondenserat kromatin med aktiv gentranskription vid acetylering, jämfört med kondenserat kromatin med inhiberad gentranskription vid deacetylering. Av Emelie Andersson 2016, textillägg av Ida Brisvåg Perman med tillstånd från upphovsman.

Metylering av vissa typer av histoner kan leda till öppnare kromatinstruktur, men oftast kopplas det till bildandet av heterokromatin. Aminosyran lysin finns på olika positioner i sidokedjorna och metylering av särskilda lysinpositioner tillåter en direkt eller indirekt omstruktu-

rering av nukleosomerna. Detta beror till stor del på vart och i vilken mängd lysinmetyleringen sker (Bannister *et al.* 2001, Lu *et al.* 2008). Indirekt kan metylering rekrytera heterokromatinproteiner som leder till en självgående metylering av närliggande nukleosomer och kromatinkondensering (Bannister *et al.* 2001). Direkt metylering sker när metylgruppen påverkar kromatinets veckning och leder till kondensering (Lu X *et al.* 2008). finns även ett samband mellan metylering och deacetylering, där de kemiska modifieringarna kan reglera varandra (Stewart *et al.* 2005).

Epigenetiska markörer signalerar bivalenta domäner – en förutsättning för pluripotens

Att säga att stamceller karakteriseras av öppen kromatinstruktur är något av en förenkling. Det är sant att vissa sektioner hålls redo för snabb transkription, men stamceller har generellt en väldigt låg delningshastighet. Stamceller brukar karakteriseras av en ”quiescence” eller stillhet, att de under större delen av tiden uppvisar en inaktivitet jämfört med somatiska celler (Beck 2005). Detta beror på att även om generna hålls tillgängliga så är dess promotor starkt reglerad.

För att skapa ett genuttryck krävs att genen transkriberas från DNA till RNA och översätts till aminosyror. Promotorn är en sekvens av DNA som befinner sig strax uppströms om genen i fråga och inleder transkriberingen av genen. Genom att reglera promotorer regleras även tystandet av genen, utan att den aktuella gensekvensen måste hållas inaktiverad (Hartwell *et al* 2008).

En epigenetisk markör är samma sak som en histonmodifiering och behöver inte enbart appliceras på en gen, utan även på promotorn som aktiverar gentranskriptionen.

Epigenetiska markörer kan åstadkomma tre olika typer av tillstånd för promotorer: aktivt, inaktivt och delvis aktivt. Ett delvis aktivt tillstånd innebär att promotorerna hålls under restriktiva och icke-restriktiva tillstånd samtidigt, och sker både när repressiva och aktiverande markörer verkar på samma gång (Bernstein *et al.* 2006, Grafi & Barak 2015).

I djurs stamceller har observerats en hög halt av den kondenserande markören H3K27me3 (Histon 3 vars lysinposition nr 27 har trimetylerats), som associeras med inaktiv promotor, och en lägre men ändå märkbar halt av den dekondenserande markören H3K4me3, som ofta uppmärksammas vid aktiv transkription (Bernstein *et al.* 2006). Båda dessa markörer återfinns i både djur- och växtceller (Turck *et al.* 2007). Dessa gener uppvisar ett lågt genuttryck kopplat till stamcellers quiescence, men vid en ökning av det dekondenserande H3K4me3 minskar samtidigt H3K27me3 och promotorerna blev snabbt aktiva. Slutsatsen som dragits av detta tillstånd är att gener som leder till differentiering hålls tystade, men redo att snabbt aktiveras vid behov via närvaron av H3K4me3. Denna egenskap har gjort att bivalenta domäner har kommit att ses som karakteristiska för pluripotenta celler (Bernstein *et al.* 2006). Växters histonmodifikationer är inte lika noggrant studerade som djurs, men data visar att liknande förhållanden finns i växtceller. Exempelvis i vissa gener hos groende frön (Saleh *et al.* 2007) och vid promotorn för gener involverade i vernalisering, grodd eller blomning efter en period av kyla. Där har båda nämnda markörer observerats samtidigt med en ökning av den inaktiverande H3K27me3 under nedkylning. Vid återuppvärmning ökar istället andelen H3K4me3 i mitotiskt aktiva celler vid återuppvärmning, men ej i mogna blad (Finnegan & Dennis 2007). En studie har gjorts där dynamiken mellan aktiverande och inhiberande markörer hos i meristem och bladanlag jämförs med den hos djurceller. Stora likheter noterades med en bivalent uppsättning som övergick från en större andel inhiberande till aktiverande vid differentiering (Wollmann *et al.* 2012).

För att kunna undersöka om celler under stress uttrycker egenskaper och genprodukter som motsvarar en dedifferentierande cell behövs tillgången till en dedifferentierande cell att jämföra med. För detta används protoplaster.

Protoplaster i jämförelse med dedifferentierande cell

Protoplaster är celler utan cellvägg och spelar en vital roll i kultiveringen av somatisk embryogenes där de via *in vitro* kan ge upphov till en helt ny planta (Takebe *et al.* 1971). Dessa typer av celler fås genom att enzymer bryter ner cellväggen för en somatisk cell eller genom att väggen på mekanisk väg avlägsnas med verktyg (Frearson *et al.* 1973, Schirawski *et al.* 2000). Protoplasterna har förmågan att dedifferentiera, återgå till cellcykeln och under inflytande av hormoner regenerera ny vävnad oberoende av tidigare celltyp (Debeaujon & Branchard 1992). Anledningen till detta och till att protoplaster kan användas som ett exempel på dedifferentierande celler är att de uppfyller dessa krav och har genuttryck samt kromatinstruktur som motsvarar den hos en dedifferentierande cell.

Förlust av specialisering i protoplaster

Strax efter avlägsnandet av cellvägg förändras genuttrycket i protoplasterna. Framstående är en ökning av uttryck från ubiquitingener som finns bevarade i alla eukaryoter och har många olika roller. Typer av observerade ubiquitin mRNA agerar som en biokemisk markör för proteiner som ska förstöras, vilket sker tillsammans med ett ubiquitinproteasom-system. (Hershko 1988). Därför är det troligt att ökningen av ubiquitin-genprodukter i protoplaster även är involverad i degraderingen av proteiner som ej längre har en funktion och/eller bristfälliga proteiner till följd av stress. Uppmärksammat är att proteiner involverade i fotosyntesen bryts ner. Ökningen av denna typ av genaktivitet skulle därför kunna vara inblandad i dedifferentieringsprocessen där resterna av den tidigare funktionen bryts ner (Jamet *et al.* 1990). Även ubiquitingener som är involverade i regleringen av cellcykelns stadier och celldelning återfinns i protoplaster, vilket tyder på en beredskap till ny differentiering (Krek 1998, Peters 1998).

Protoplasters kromatinstruktur

Mycket pekar på att protoplaster har en pluripotentliknande kromatinstruktur. I experiment med heterokromatinprotein (HP1) i tobaksplantor har man observerat att i differentierade blad var HP1 bundet i cellkärnan. Vid omvandlandet till protoplaster förflyttades dock en viss mängd av proteinet till cytoplasman, ett fenomen som associeras med acetyleringen av vissa histoner och dekondensering av kromatin (Williams *et al.* 2003). Protoplaster visar då på en förskjutning mot öppnare kromatin.

En motsvarighet till stamcellers quiescence finns i dedifferentierande protoplaster som periodvis genomgår kromatinkondensering och dekondensering. Det har observerats att många av de gener som kondenseras är kopplade till ribosomalt RNA (Williams *et al.* 2003). Detta är någonting som observerats vid övergången från differentierad bladcell till protoplast (Gigot *et al.* 1975). Då ribosomer är inblandade i proteinsyntes kan en sådan strukturförändring leda till att translationen av mRNA minskar, vilket innebär tystade genuttryck och ett quiescent-liknande stadium. Detta har teoretiserats vara en del av dedifferentieringen då proteiner från det specialiserade stadiet städas bort (Jamet *et al.* 1990). Detta kan stödjas av att en dekondensering av dessa gener sker i samband med att protoplasten återgår till cellcykeln och förbereder differentiering (Williams *et al.* 2003).

Protoplaster har visat sig genomgå cykler av kromatinkondensering och dekondensering, men för att de ska kunna återgå till cellcykeln och påbörja arbetet med att utveckla ny vävnad och organ krävs involveringen av tillväxtfaktorer i form av fytohormoner, dvs. växthormoner. Sker inte detta kommer protoplasterna genomgå en programmerad celldöd (Zhao *et al.* 2001).

Stress som faktor vid dedifferentiering

Stress för växter är när en faktor, biotisk eller abiotisk, har en negativ påverkan på organismens celler i fråga om tillväxt, utveckling och reproduktion och leder till en form av respons. Växter i sin egenskap av sessila organismer är starkt beroende av sin plastiska förmåga för att reglera och åtgärda följderna av stress.
Biotiska stressfaktorer är inverkan av levande organismer såsom herbivorer, parasiter, svampar, virus, bakterier, eller andra växter med negativ påverkan. Abiotiska faktorer syftar på icke-levande fenomen som torka, saltmängd, vind, näringstillgång och skuggning.
Vilken respons detta ger i växten varierar. Det kan leda till en kortsiktig förändring, såsom stängning av stomata för att bevara fukt vid tillfällig torkstress, eller en förändring över tid som ett mer utvecklat rotsystem vid långvarig torka. Responsen kan påverka växtens genuttryck på flera olika nivåer, från förändringar i DNA till kromatinstruktur, transkriptionen eller de färdigsyntetiserade proteinerna. De kan påverka växtens utveckling, exempelvis genom att hålla tillväxten kort för att bättre överleva i en vindpinad miljö, eller vara icke-adaptiv med frigörandet av skadliga föreningar som ett motangrepp mot betande insekter (Reece & Campbell 2011).

Förändringar i genuttryck som en följd av stress

Flera experiment har utförts som visar att tork- och saltstress leder till en sänkt proteinsyntes liknande den som sker vid det quiescence-liknande tillståndet i protoplaster. I ett försök undersöktes hur tork- och saltstress påverkade omsättningen av aminosyran L-leuicine ^{14}C till proteiner i bondtobaksblad (*Nicotiana rustica*). Man observerade att oberoende av typ av stress skedde en ungefär halvering av proteinsyntesen (Ben-Zioni *et al.* 1967). Ett liknande experiment för torkstress har utförts på bermudagräs (*Cynodon dactylon*) vilket gav liknande resultat och även noterades att vid svår torkstress skedde dessutom en viss inhibering av fotosyntes samt lagring av stärkelse, förutom sänkt proteinsyntes (Barnett & Naylor 1966).
I ett annat experiment undersöktes hur olika faktorer av torkstress påverkade proteinsyntesen i havre (*Avena sativa*). Torkstress orsakar en ackumulering av stresshormonet abskisinsyra (ABA) samt ett sänkt hydrostatiskt tryck. I experimentet jämfördes dessa faktorer var för sig med effekten av torkstress. Det kunde inte fastställas att hydrostatiskt tryck påverkade proteinsyntesen. ABA och torkstress visade däremot på en sänkt proteinsyntes, men med olika effekter. ABA påverkade generellt proteinsyntesen medan torkstress påverkade mönstret där syntesen av vissa proteiner påverkades mer än andra. Effekten av ABA kunde dessutom nästan helt inhiberas genom tillsatts av gibberliner (GA). Utifrån detta drogs slutsatsen att ABA och torkstress oberoende av varandra kunde påverka proteinsyntesen (Dhindsa & Cleland 1975).
En minskad proteinsyntes behöver dock inte betyda en nermontering av specialisering.
Det har även observerats ökningar av ubiquitin-genuttryck av samma storleksklass som i protoplaster hos både kyckling- (*Gallus gallus domesticus*) och majsceller (*Zea mays*) utsatta för stress (exempelvis värmestress). De har därför tolkats som en typ av stressproteiner för eukaryoter (Bond & Schlesinger 1985, Christensen & Quail 1989 och Fornace *et al.*1989).
Stress leder därmed i många fall leder till en sänkt proteinsyntes i somatiska celler, och även till ett höjt stressuttryck som även återfinns i protoplaster.

Kromatinremodellering som en respons av stress

Som tidigare nämnts är kromatinstruktur en förutsättning för celldedifferentiering och omprogrammering. Ett stadium av ökad dekondensering associeras med förmågan till pluripotens. Motsvarigheter för detta har setts i somatiska celler under stress.
Groddplantor av majs utsatta för köldstress har visat på en minskad grad metylering över genomet. Detta observerades i screenade somatiska celler från rotvävnad (Steward *et al.* 2002).

Demetylering kan i sin tur leda till dekondensering av kromatinet.
Eftersom regleringen av metylering orsakar förändring i genuttrycket resoneras att utbredd demetylering vid köldstress kan ha till funktion att reglera ett stort antal gener samtidigt (Steward *et al.* 2002).
I ett annat försök med majs utsattes plantor för ljusstress genom UV-B strålning. Bladceller från dessa visade på en utbredd acetylering av H3 och H4 sidokedjor, vilket associeras med kromatindekondensering. Masspektrometri visade även en ökning av genprodukter från kromatinreglerande gener. Mutanter med lägre tålighet för UV-B strålning hade även en lägre genproduktion av kromatinreglerande gener än plantor av vildtyp och tog tidigare skada av behandlingen. Slutsatsen av detta var att förmågan till kromatinmodifiering och histon acetylering har en viktig roll i responsen och anpassningen till ljusstress orsakat av UV-B (Casati *et al.* 2008)
I ett experiment med syfte att undersöka hur stress inverkar på kromatinstruktur jämfördes inmärkta cellkärnor från protoplaster och stressade somatiska celler. Stress applicerades i form av mörker respektive värme. I protoplaster observerades cyklerna av kondensering och dekondensering. Inledningsvis med en hög grad heterokromatin följt av deheterosering (Florentin *et al.* 2013), vilket tidigare visats vara karakteristiskt för protoplaster i avsaknad av fytohormoner (Zhao *et al.* 2001). I de stressade cellerna kunde öppen kromatinstruktur observeras efter långvarig värmestress och efter mörkerexponering (Florentin *et al.* 2013).
Vid studie kring var kromatinmodifieringar sker i *A. thaliana* under torkstress redovisades en spridning av epigenetiska markörer. Den största förändring i distribuering noterades hos H3K4me3. H3K4me3 associeras med öppen kromatinstruktur och hög transkription. Markören ackumulerades starkt vid gener inblandade i torkrespons (van Dijk *et al.* 2010). Till exempel vid gener som inducerar syntesen av abskisinsyra, och torkstressgenen *RD29B*. Det noterades dock att trots ackumulering av H3Kme3 vid *RD29B*-genen så var nukleosomtätheten vid dess promotor låg, en faktor som brukar innebära låg transkription (Kim *et al.* 2008).
Grafi & Barak (2015) drar paralleller mellan detta och bivalenta regioner i differentierande celler. De menar att förhållandet med hämmande och stimulerande faktorer tyder på att genen hålls delvis aktiv för snabb reglering av transkriptionen. Denna teori har stöd av en kartläggning av kromatintillstånd i *A. thaliana*. Där verkar både den repressiva H3K27me1 och den aktiverande H3K4me3 markören på *RD29A*-genen, och *RD29B*-genen regleras på ett liknande sätt (Roudier *et al.* 2011).

Senescens – en dedifferentierande cell under stress?

Senescens betyder åldrande och i växter kännetecknas det ofta av den programmerade förändring blad genomgår i slutet av sitt liv. Senescens leder till en förlust av vitalitet där cellerna förlorar tillväxtförmåga. Så kallad mitotisk senescens är ett stadie under senescensen som innebär att celler förlorar förmågan att dela sig, postmitotisk senescens är den process där cellen aktivt degenererar och oftast dör (Gan 2003). I den bemärkelsen kan senescens ses som en typ av stress. Senescens är dock ingenting som plötsligt drabbar celler och vävnad. Det är en starkt reglerad process med funktionen att gynna växten som organism. Senescens sätter in i vid abskission, fällning av växtdelar som löv, frukt eller kronblad. En funktion som exempelvis minskar vatten- och energiförlusten under tempererat vinterförhållanden (Reece & Campbell 2011). Fortsättningsvis kommer senescens användas om celler involverade i förändringar specifikt i bladceller.
Degraderingen av mesofyllcellen (grundvävnad i blad) sker via strikt reglerade mekanismer där de proteinrika kloroplasterna bryts ner först och kan ses som gulnande av bladen. Cellkärnan blir kvar tills slutskedet av förloppet varefter cellväggarna bryts ner och cellen dör (Gan

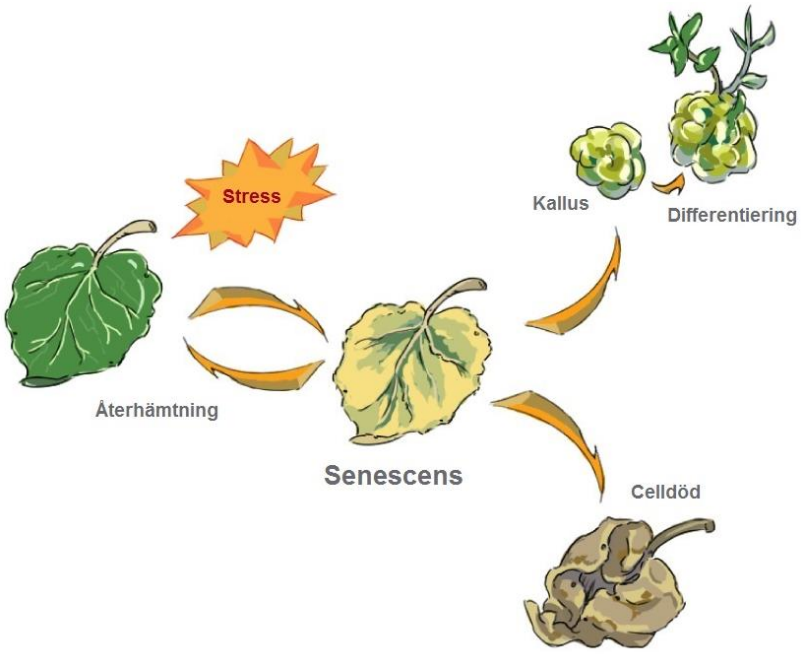
2003). Näringsämnen transporteras från senescerande löv till lagring, frön eller nya bladbildningar. Att cellkärnan då blir kvar till slutet och reglerar uttransporten är därför viktigt. Senescens är inte frågan om en programmerad celldöd så mycket som det är en mekanism för att fördröja celldöd tills cellen städats ur (Himelblau & Amasino 2001).

Senescens och stress

Även om lövsenescens ofta är en programmerad process i växtens liv är den även starkt influerad av miljön. Det är väl dokumenterat att olika typer av stress ofta kan leda till en senescensrespons. Exempelvis kan patogenangrepp i ett blad leda till att senescens sätter in. Bladet utvinns på sina makromolekyler innan det offras för att inte resten av plantan ska angripas. Andra stressfaktorer som kan inducera förtida senescens är exempelvis torka, näringsbrist eller stress orsakad av strålning (översiktligt Buchanan-Wollaston *et al.* 2003). Mörkerstress är ett vanligt sätt att orsaka senescens i blad. Analyser av genuttryck visar att mörkerbehandling tidigt leder till transkription från senescensassocierade gener (SAGs). Senescenslika symptom, som gulnande löv, kan också ske som följd av CO_2-brist när ljus-fotosyntesen inte fungerar. Men transkription från gener kopplade till det uppkommer långt senare än SAG uttryck, och hopblandning av dessa kan undvikas (Lin & Wu 2004). Därmed används gärna mörkerstress för att inducera senescens.

Senescens och dedifferentiering

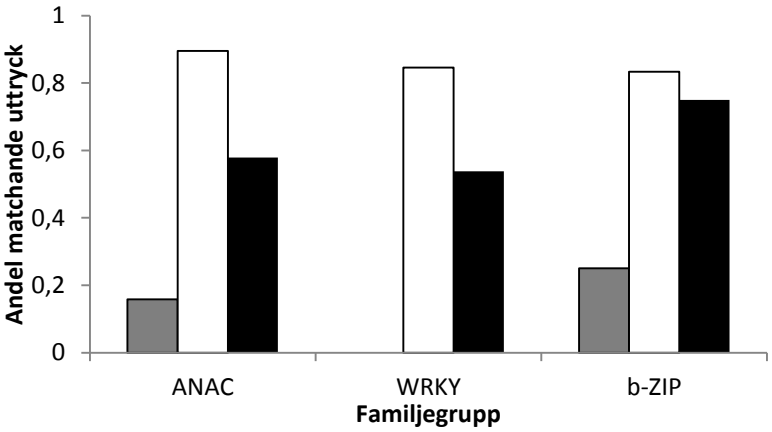
Senescens är ett övergångstillstånd som inte nödvändigtvis måste leda till celldöd (figur 2). I ett experiment visades att senescerande celler kunde redifferentiera och återgå till funktionella mesofyllceller. Helt gulnade blad blev gröna efter cytokininbehandling. Det observerades att det handlade om senescerande celler, där plastiderna hade krympt och stroma samt membransystem hade brutits ner. Man observerade också andra komponenter som större plastoglobuli och stärkelseinlagringar, vilket inte motsvarades i vanliga mesofyllceller. Efter behandling återbildades degraderade komponenter och fotosyntes återupptogs. Man kunde se att det rörde sig om senescerade celler som återhämtat sig då de fortfarande hade förstorat plastoglobuli och stärkelse (Zavaleta-Mancera *et al.* 1999). Senescerande har därför vissa likheter med dedifferentierande celler när det kommer till nedmontering av struktur och återspecialisering. Förutom detta uppvisar senescerande celler andra karaktärsdrag som tillskrivs stamceller och dedifferentierande celler. Histonacetyltransferaser (HAT) är kopplade till dekondensering av kromatin och aktiv transkribering av gener. HAT gener har visat på ökad grad av uttryck i protoplaster och i senescerande celler från *A. thaliana*. Båda typerna av celler har också visat på en reduktion av genuttryck som åstadkommer ökning av heterokromatin och kondensering. Exempelvis histonmetyltransferaser (Damri *et al.* 2009). I ett försök att undersöka hur spridd dekondensering är i en senescerande cells genom behandlades senescerade tobaksbladsceller med microkocker nukleas (MNase) som bryter ner DNA. Detta sker i lägre takt om DNA:t är skyddat i en tät nukleosomstruktur. Försöket visade på en större genomglobal känslighet för



Andersson 2016, textillägg av Ida Brisvåg Perman med tillstånd från upphovsman

MNase i senescerade celler, vilket ökade ju längre mörkerbehandlingen pågick. Detta innebar troligen att vid ökad spridning av senescens ökade även kromatindekondenseringen i cellerna (Damri *et al.* 2009). Anmärkningsvärt är också att senescerade bladceller från tobak har *in vitro* med reglering av fytohormoner kunnat bilda kallus och återbilda rötter och skott, precis som en protoplastcell (Damri *et al.* 2009).
Senescerande celler påminner därmed om dedifferentierande celler i och med följande faktorer: Degenereringen av tidigare funktion/specialisering (nedbrytningen av plastider), förutsättningen för pluripotens genom öppen kromatinstruktur, en genreglering som inom vissa områden är mycket lik regleringen av dedifferentierande cellers (protoplaster) och med stora likheter med stamceller (apikala skottmeristemet), samt förmågan till redifferentiering i och med återbildandet av organeller, bildandet av pluripotent kallus med återgång till cellcykeln och programmerad celldöd (figur 2).

Reglering av transkriptionsfaktorer – Senescens, SAM, mesofyll och protoplast
Paralleller har i olika undersökningar dragits mellan celler som genomgår senescens och differentierande celler. Grafi *et al.* (2011) gjorde en sammanställning över genuttryck från ett antal familjer av transkriptionsfaktorer i *A. thaliana*. I sammanställningen undersöktes reglering av transkriptionsfaktorer i olika celltyper (närvaron av transkriptionsfaktor bedömdes vid uttryckssignal (log2) över 8). Uppgifterna kom från tre undersökningar. En analys av gener från apikala skottmeristemet (SAM) hos *A.thaliana* (Yadav *et al.* 2009). En utvärdering av komplementärt DNA (cDNA) från senescerande löv via en mikromatris. Senescens åstadkoms genom fem dagars mörkerbehandling där ett antal familjer av transkriptionsfaktorer kopplades till detta tillstånd (Lin & Wu 2004). I den tredje undersökningen analyserades protoplaster via mikromatris (Damri *et al.* 2009). Dessa uppgifter tillät en jämförelse mellan genuttryck i somatiska bladceller, dedifferentierande celler (protoplaster), senescerande celler och stamceller (apikalmeristem). Grafi *et al.* (2011) kunde se en tydlig ökning från familjegrupperna ANAC, WRKY och b-ZIP i både senescerande celler och protoplaster.
Dessa familjer har kopplats till diverse stressrespons (Cheong *et al.* 2002), där exempelvis WRKY har verkat som en angreppsrespons och har inducerats av exempelvis skada eller patogener (Chen & Chen 2000, Robatzek & Somssich 2001).
I en uppställning över andelen transkriptionsfaktorer i varje familj, som regleras på samma sätt som i protoplaster (figur 3), kan man se en tydlig trend för senescerande celler att uttrycka transkriptionsfaktorer på samma sätt som protoplaster. Man kan även se att protoplaster reglerar över hälften av dessa transkriptionsfaktorer på samma sätt som meristemcellerna.



Figur 3. Andelen uttrycksreglering (närvaro eller frånvaro) av transkriptionsfaktorer som överensstämmer med protoplastcell per familjegrupp av transkriptionsfaktorer. Jämfört med somatisk lövcell (grå), senescerande cell (vit) och apikal skottmeristemcell (svart). Baserad på data från Grafi *et al.* 2011.

ANAC2 och dess koppling mellan stress och dedifferentiering
För att utreda en möjlig koppling i respons hos en cell under stark stress och en cell under dedifferentiering gjordes ett antal försök med fokus på ANAC2 genen (också kallad ATAF1) och dess promotor. Uppreglering av promotorn för ANAC2 genen har rapporterats i meristem

(Yadav *et al.* 2009), dedifferentierade protoplaster (Damri *et al.* 2009) och i celler under olika typer av stress exempelvis torka (Lu P-L *et al.* 2007), patogen och mekaniska angrepp (Collinge & Boller 2001, Jensen *et al.* 2007), samt mörkerstress (Lin & Wu 2004). Undersökningen syftade till att fastställa ANAC2 promotorns aktivitet i dessa celltyper och huruvida man utifrån detta kan dra en slutsats kring stress och pluripotens genom dedifferentiering (Florentin *et al.* 2013). En transgen *A. thaliana* framställdes med en reportergen, AtMBD6 fuserad med grönt fluorescerande protein (GFP), nedströms om ANAC2 promotorn. Detta tillät att ANAC2 promoteraktivitet kunde kartläggas.
Promotorn visade sig vara aktiv i skottapikalmeristemet vid alla växtens utvecklingsstadier, så som det första utvecklingsstadiet av bladet (primordia) och fortsatte vara aktivt i bladanlag upp till en storlek av 200 µm. Den var aktiv i alla typer av meristem och diverse andra vävnader under utveckling, exempelvis rotmössan, primärroten i veckogammal grodd och laterala knoppar. Mogna löv visade endast mycket låga och sporadiska halter av uttryck. Detta indikerade en ANAC2 promotoraktivitet i stamcellslika celler, men att detta inte måste vara bundet till den centrala zonen i meristem. Stamcellslika celler kan därmed finnas i fler domän i meristemet.
I protoplaster syntetiserade från transgenplantorna observerades stark närvaro av GPF i över 95 % av cellerna inom 24 timmar. I somatiska bladceller observerades i stort sett inget uttryck av GPF vilket indikerade svag eller ingen ANAC2 promotoraktivitet.
För att undersöka uttryck i celler under svår stress utsattes celler för mörkerinducerad senescens, mekaniska skada och hetta (Florentin *et al.* 2013). Senescens var av särskilt intresse då tidigare experiment på tobaksblad visat på en koppling mellan dedifferentierade protoplaster och senescerande celler (Damri *et al.* 2009). Transgena plantor visade på senescens efter 5 dagars mörkerinkubering i och med stoppad tillväxt och gulnande blad. I dessa fanns en stark spridning av GPF i bladen vilket visade på aktiverad ANAC2 promotor. Möjligheten att dessa celler redan påbörjat programmerad celldöd uteslöts då inkuberade celler på tillväxtmedium *in vitro* utvecklade kallus. Senescerade celler visade sig även mer effektiva vid kallusbildning än icke mörkerbehandlade bladceller. Plantor utsatta för mekanisk skada genom snitt gav AtMBD6-GPF uttryck inom 24 timmar och observerades i bladceller upp till 200-300 µm från snittytan. För värmestress utsattes plantor för 37 °C under 4, 18, 20 respektive 22 timmar varefter genuttryck undersöktes omedelbart eller efter 24 timmars återhämtningsperiod. Växter exponerade för värme i mer än 20 timmar dog efter några dagar medan plantor under kortare behandling överlevde. Ingen ANAC2 promotoraktivitet kunde observeras omedelbart efter värmebehandlingen, men visade sig efter 24 timmars återhämtning i plantor utsatta för längre behandling än fyra timmar. Värmechockproteinet HSP17.6 observerades i plantor omedelbart efter behandling så tidigt som efter två timmars värmeexponering.
För att se om dessa stresstillstånd delade fler egenskaper med dedifferentierade celler undersöktes kromatinstrukturen i de stressade cellerna. Centrometriskt och pericentriskt kromatin analyserades med fluorescenserande *in situ* hybridisering (FISH). Detta användes på celler utsatta för mörker och värme, samt protoplaster. Dekondensering av pericentriskt kromatin observerades vid mörkerbehandling, lång period av värmestress samt i protoplaster. Återkondensering av pericentriskt protoplastkromatin skedde efter 48 timmar (Florentin *et al.* 2013).
Sammanfattningsvis visade undersökningen att genuttryck kopplade till pluripotenta meristemceller, men ej till somatiska celler, återfinns i dedifferentierande protoplastceller samt kan aktiveras vid mörkerinducerad senescens liksom mekanisk skada och som en följd av en viss tids värmestress. Exempel visades på dedifferentiering av senescerade celler till pluripotenta kallusceller. Vidare kunde en typ av kromatindekondensering observeras i protoplastceller så väl som i celler utsatta för ovanstående stressfaktorer.

Diskussion

I det här arbetet har jag kollat på hur och om fenomenet dedifferentiering, som bevisats *in vitro,* också har en motsvarighet *in vivo* som en möjlig respons i växtceller för vissa typer av stress. Utgångspunkten är en teori om att protoplaster kan vara en modell för dedifferentierande celler och att det finns en likhet mellan modellen och celler utsatta för stress, framför allt celler som genomgår senescens.

Protoplaster som en modell för dedifferentiering

För att kunna dra en slutsats om ett samband mellan dedifferens och stress genom jämförelse med protoplaster krävs att dessa rimligtvis kan motsvara en cell i dedifferentiering.

Vid själva skapandet av en protoplast genomgår den somatiska cellen en förlust av funktion då den förlorar sin cellvägg. Vidare tycks det som att protoplasten fortsätter degraderingen genom nedbrytningen av fotosyntesproteiner och syntetiseringen av genprodukter från ubiquitin med uppgiften att bryta ner proteiner som förlorat funktion (Hershko 1988, Jamet *et al.* 1990). Detta skulle då kunna vara proteiner som var delaktiga i cellens tidigare funktion men som nu bryts ner till följd av den specialiserade cellväggens försvinnande. Protoplaster uppvisar även mekanismer som tillåter pluripotens. Till det hör en ökning av dekondenserande genuttryck vilket kan leda till en öppen kromatinstruktur (Williams *et al.* 2003). Man har också observerat att protoplaster genomgår stadier av kondensering och dekondensering (Zhao *et al.* 2001). Kondenseringen drabbar då framförallt inaktivering av gener kopplade till proteinsyntes (Jamet *et al.* 1990), vilket kan betyda att proteiner för specialisering hålls tystade till dess cellen kan differentiera.

Protoplaster kan då sägas ha stamcellsliknande egenskaper då den genomgår förlust av specialisering, uppvisar bivalenta domäner med snabb förmåga till kondensering och dekondensering som innebär att cellen hålls beredd på att snabbt inleda dedifferentiering och syntetisera gentranskription. Bevisligen kan protoplaster med rätt behandling även utvecklas till en annan celltyp än donatorcellen, exempelvis i försök med bladceller som kan ge upphov till an helt ny planta (Frearson *et al.*1973). Även utan fytohormoner kan protoplaster genomgå en förändring som liknas vid programmerad celldöd. Det vill säga, celler slutar bara inte fungera utan den genomgår en starkt reglerad omstrukturering som slutar med cellens upplösande. Med andra ord, en typ av omprogrammering (Zhao *et al.* 2001).

Grafi & Barak (2015) belyser tanken om likheten mellan protoplaster och stressade celler beror på att protoplaster faktiskt *är* celler som existerar under stark stress. Förlusten av cellvägg är en dramatisk förändring för cellen och leder till en minskad tillväxt. Här undersöktes dock kopplingar mellan cellstress och dedifferentiering. Att protoplaster är en cell i stress negligerar inte ovanstående liknelse till en dedifferentierad cell. Det man istället kan hypotisera är ifall stamceller och stressade celler delar karaktärsdrag, men det är inte fokus för den här undersökningen.

Det går därför att använda protoplaster som en modell för en dedifferentierande cell vid jämförelse med celler i stress.

Likheter mellan stress och dedifferentiering

Förändring i kromatinstruktur och reglering överensstämmer

Dekondensering av stor del av kromatinet har observerats i celler utsatta för mörker och värmestress. Detta uttryckte sig i cykler av kondensering och dekondensering, vilket brukar kopplas till protoplasters kromatinstruktur (Florentin *et al.* 2013). Epigenetiska markörer som bidrar till minskad grad heterokromatin har observerats i växter utsatta för köld- och strålningsstress (Steward *et al.* 2002, Casati *et al.* 2008). Under torkstress har celler visat på en

närvaro av repressiva och inducerande epigenetiska markörer påminnande om bivalenta domäner i pluripotenta celler (Kim *et al.* 2008, van Dijk *et al.* 2010). Det finns därmed skäl att dra paralleller mellan genregleringen i stressade celler och i dedifferentierande celler.
Ett problem är att mycket av den forskning som bedrivs kring epigenetiska markörer för kromatin är gjord på djurceller. Studier på växtceller är långt mindre utforskad. Även om det finns goda skäl att tro att det sker via en liknande reglering så är inte området utforskat till den grad att det kan sägas med säkerhet.

Ingen bekräftad förlust av specialisering
Dedifferentiering inleds med en nedbrytning av specialiserade komponenter, vilket jag delvis kopplar till förändringar i proteinsyntes hos protoplaster. Det är tydligt att stressfaktorer också kan ge en sänkning av proteinsyntes (Barnett & Naylor 1966, Ben-Zioni *et al.* 1967, Dhindsa & Cleland 1975), men i de flesta fall kan jag inte avgöra om sänkningen av proteinsyntes kan kopplas till en nedmontering av funktion. Mer tydligt framgår att den sänkta proteinsyntesen är ett symptom av stress i sig, då vitaliteten går ner och påverkar cellens produktionsförmåga.

Liknande reglering av genuttryck
En typ av stressresponsproteiner som härstammar från ubiquitingener finns både i stressade celler, protoplaster och i senescerande celler (Bond & Schlesinger 1985, Christensen & Quail 1989 och Fornace *et al.*1989).
Framför allt har man kunnat spåra likheter i genuttryck mellan dedifferentierande celler och stressade celler genom aktivitet från ANAC2 genens promotor, som finns i växters stamcellsvävnad och vid initieringen av organutveckling. I somatiska celler utan stressbehandling fanns endast en försumbar mängd aktivitetsmarkörer. I somatiska celler utsatta för mekanisk skada, mörker och värmestress eller i protoplaster noterades dock en tydlig ackumulering. Genen har sedan tidigare visat sig involverad vid olika stressresponser, men jämförs här som en koppling till pluripotens. Genuttryck från transkriptionsfaktorfamiljerna WRKY och B-zip är också kopplade till celler under olika typer av stress och har visat sig till hög grad uppreglerade i protoplaster (det vill säga dedifferentierande celler) och även till viss del i skottapikalmeristem (Damri *et al.* 2009, Florentin *et al.* 2013). Det finns alltså ett samband mellan vissa genuttryck från celler i stress och dedifferentierande celler.
Från de här jämförelserna går det att se likheter i vissa karaktärsdrag i stressade celler och pluripotenta celler. Men det är svårt att värdera likheterna utan att kunna sätta dem i relation till reglering och genuttryck mellan dessa celltyper i stort. Det finns vissa kopplingar, men det är oklart till hur stor del dessa kopplingar påverkar cellens benägenhet till dedifferentiering. En starkare korrelation finns dock till celler som genomgår senescens.

Senescens som den felande länken mellan stress och dedifferentiering
Förtida senescens är starkt stressinducerad och kartläggning av senescensassocierade gener gör att tillståndet kan bevisas (Lin & Wu 2004). Senescensprocessen har även starka likheter med dedifferentiering. Här finns en tydligt påvisad nedmontering av cellens specialiserade funktion som en respons till stressignaler. Senescens leder ofta till programmerad celldöd, kan också visa på redifferentiering av nedmonterade organeller samt återgång till cellcykeln efter inducerad kallusformering (Zavaleta-Mancera *et al.* 1999, Gan 2003, Damri *et al.* 2009). Senescerande celler har även visat på både öppen kromatinstruktur och genuttryck kopplade till kromatindekondensering (Damri *et al.* 2009). En somatisk cell som genomgår senescens kan därför sägas kapabel till att återfå pluripotens.
I jämförelse med protoplaster uppvisar senescerande celler stora likheter vad gällande genuttryck av ANAC, WRKY och B-zip familjerna som inte återfinns i tillnärmelsevis lika hög grad i funktionella bladceller (Grafi *et al.* 2011). Eftersom senescens är starkt kopplat till

stress och även uppvisar stora likheter med dedifferentierade celler anser jag att dedifferentiering rimligtvis kan ses som en respons av stress i förtida senescerande celler.

Slutsats

En stark korrelation mellan generell stress i växtceller och återgång till ett pluripotent stadium är svår att dra med nuvarande material. Trots likheter med dedifferentierande celler i kromatinkonformation och reglering av genprodukter saknar jag fortfarande tydligt bevis på en nedrustning av specialiserade strukturer. Jag skulle vilja titta mer på hur proteinanalys kan användas för att få mer information om ämnet. Dock är proteinanalys är ett mycket stort område och en ordentlig granskning skulle behöva en egen utredning.

Ett tydligt sammanband kan dock ses mellan stress och dedifferentiering när det gäller celler som genomgår senescens. Där har vi en tydlig nedmontering av tidigare specialisering i och med nedbrytningen av organeller. Det finns även en stark korrelation till pluripotens i och med cellens förmåga att återbilda förlorade organeller, omvandlas till en ny typ av cell *in vitro*, samt programmeras om från sin ursprungliga funktion (programmerad celldöd). Förutom detta kan man se en kromatinstruktur som påminner om stamcellslikande cellers samt en reglering av genprodukter som nära stämmer överens med främst protoplaster, men även med meristemceller och celler under stress. Till detta hör att senescens ofta uppstår som en direkt följd av stress. Utifrån senescerande celler kan jag därför dra slutsatsen att en somatisk cell kan genomgå dedifferentiering som en direkt respons på stressignaler.

Senescens orsakad av stress, såsom torkstress, leder ofta till att delar av växten dör. Det är något som har en negativ inverkan på jordbruk och skogsindustrier. Men inledd senescens behöver inte innebära slutet för den drabbade vävnaden då senescens är en process som kan vändas.

Det här arbetet visar att det finns en koppling mellan stressrespons och återtagen stamcellsförmåga. Växtceller har därmed potentialen till att svara på angrepp och miljöförändringar genom att ombilda helt nya typer av celler bättre anpassade till situationen, eller för att läka skador. Denna potential kan tyckas väl dold hos vissa växter som kräver en mycket anpassad behandling för att inte sloka. Men potentialen finns där, och möjligen kan kunskap om den användas för att öka växters förmåga att återhämta sig eller anpassa sig till växlingar i livsvillkor. Utifrån det kan vi få ett mer anpassningsbart och tåligt jordbruk, och måhända en modell som visar vägen för djurcellers förmåga till anpassning och regenerering.

Tack

Tack till mina medstudenter Marisol Avilés, Anton Björninen och Malin Jigrud för god återkoppling, särskilt till Simon Selberg och Erik Widén.
Tack även till min handledare Irene Söderhäll.
Ett särskilt tack går till Emelie Andersson för fina illustrationer och Julia Brisvåg som mycket tid till råd och omdömen.

Referenser

Arents G, Moudrianakis EN. 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**: 11170–11174.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature **410**: 120–124.

Barnett NM, Naylor AW. 1966. Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress. Plant Physiology **41**: 1222–1230.

Beck, C.B. 2005, An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century, Cambridge University Press, Cambridge, UK;New York;

Ben-Zioni A, Itai C, Vaadia Y. 1967. Water and Salt Stresses, Kinetin and Protein Synthesis in Tobacco Leaves. Plant Physiology **42**: 361–365.

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. 2006. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. Cell **125**: 315–326.

Bond U, Schlesinger M. 1985. Ubiquitin Is a Heat-Shock Protein in Chicken-Embryo Fibroblasts. Molecular and Cellular Biology **5**: 949–956.

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. Plant Biotechnology Journal **1**: 3–22.

Casati P, Campi M, Chu F, Suzuki N, Maltby D, Guan S, Burlingame AL, Walbot V. 2008. Histone Acetylation and Chromatin Remodeling Are Required for UV-B–Dependent Transcriptional Activation of Regulated Genes in Maize. Plant, Cell & Environment **20**: 827–842.

Chen C, Chen Z. 2000. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. Plant Molecular Biology **42**: 387–396.

Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. Plant Physiology **129**: 661–677.

Collinge M, Boller T. 2001. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by Phytophthora infestans and to wounding. Plant Molecular Biology **46**: 521–529.

Debeaujon I, Branchard M. 1992. Induction of Somatic Embryogenesis and Caulogenesis from Cotyledon and Leaf Protoplast-Derived Colonies of Melon (cucumis-Melo L). Plant Cell Reports **12**: 37–40.

Dhindsa RS, Cleland RE. 1975. Water Stress and Protein Synthesis II. Interaction between Water Stress, Hydrostatic Pressure, and Abscisic Acid on the Pattern of Protein Synthesis in Avena Coleoptiles. Plant Physiology **55**: 782–785.

Finnegan EJ, Dennis ES. 2007. Vernalization-Induced Trimethylation of Histone H3 Lysine 27 at FLC Is Not Maintained in Mitotically Quiescent Cells. Current Biology **17**: 1978–1983.

Florentin A, Damri M, Grafi G. 2013. Stress Induces Plant Somatic Cells to Acquire Some Features of Stem Cells Accompanied by Selective Chromatin Reorganization. Developmental Dynamics **242**: 1121–1133.

Fornace A, Alamo I, Hollander M, Lamoreaux E. 1989. Ubiquitin Messenger-Rna Is a Major Stress-Induced Transcript in Mammalian-Cells. Nucleic Acids Research **17**: 1215–1230.

Frearson E, Power J, Cocking E. 1973. Isolation, Culture and Regeneration of Petunia Leaf Protoplasts. Developmental Biology **33**: 130–137.
Gan S. 2003. Mitotic and Postmitotic Senescence in Plants. Science of Aging Knowledge Environment **2003**: re7.
Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. 2011. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. Nature Reviews Molecular Cell Biology **12**: 36–47.
Gigot C, Kopp M, Schmitt C, Milne RG. 1975. Subcellular changes during isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts. Protoplasma **84**: 31–41.
Golldack D, Lueking I, Yang O. 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. Plant Cell Reports **30**: 1383–1391.
Grafi G, Barak S. 2015. Stress induces cell dedifferentiation in plants. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms **1849**: 378–384.
Grafi G, Chalifa-Caspi V, Nagar T, Plaschkes I, Barak S, Ransbotyn V. 2011. Plant response to stress meets dedifferentiation. Planta **233**: 433–438.
Hartwell L.H, Hood L, Goldberg M.L, Silver L.M, Veres R.C. 2008, Genetics: from genes to genomes, 3rd edition, McGraw-Hill, Boston.
Hay ED. 1959. Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating Amblystoma limbs. Developmental Biology **1**: 555–585.
Hershko A. 1988. Ubiquitin-mediated protein degradation. The Journal of Biological Chemistry **263**: 15237–15240.
Himelblau E, Amasino RM. 2001. Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. The Journal of Plant Physiology **158**: 1317–1323.
Jamet E, Durr A, Parmentier Y, Criqui M-C, Fleck J. 1990. Is ubiquitin involved in the dedifferentiation of higher plant cells? Cell Differentiation and Development **29**: 37–46.
Jensen MK, Rung JH, Gregersen PL, Gjetting T, Fuglsang AT, Hansen M, Joehnk N, Lyngkjaer MF, Collinge DB. 2007. The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and Arabidopsis. Plant Molecular Biology **65**: 137–150.
Jerzmanowski A. 2007. SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression **1769**: 330–345.
Kim J-M, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, Toyoda T, Kimura H, Shinozaki K, Seki M. 2008. Alterations of Lysine Modifications on the Histone H3 N-Tail under Drought Stress Conditions in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiology **49**: 1580–1588.
Krek W. 1998. Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. Current Opinion in Genetics & Development **8**: 36–42.
Lin J-F, Wu S-H. 2004. Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. The Plant Journalournal **39**: 612–628.
Luo M, Liu X, Singh P, Cui Y, Zimmerli L, Wu K. 2012. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms **1819**: 129–136.
Lu P-L, Chen N-Z, An R, Su Z, Qi B-S, Ren F, Chen J, Wang X-C. 2007. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. Plant Molecular Biology **63**: 289–305.
Lu X, Simon MD, Chodaparambil JV, Hansen JC, Shokat KM, Luger K. 2008. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. Nature Structural & Molecular Biology **15**: 1122–1124.
Meyerowitz EM. 2002. Plants Compared to Animals: The Broadest Comparative Study of Development. Science **295**: 1482–1485.

Moser JJ, Fritzler MJ. 2010. Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology **42**: 828–843.

Paek K-Y, Hahn E-J, Son S-H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **37**: 149–157.

Peters J-M. 1998. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. Current Opinion in Cell Biology **10**: 759–768.

Reece, J.B. & Campbell, N.A., 1946-2004 2011, Campbell Biology, 9th, Global edition, Pearson Education, San Francisco.

Robatzek S, Somssich IE. 2001. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. The Plant Journal **28**: 123–133.

Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Després B, Drevensek S, Barneche F, Dèrozier S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette M-L, Robin S, Caboche M, Colot V. 2011. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis: Organization of the Arabidopsis epigenome. THE EMBO JOURNAL **30**: 1928–1938.

Saleh A, Al-Abdallat A, Ndamukong I, Alvarez-Venegas R, Avramova Z. 2007. The Arabidopsis homologs of trithorax (ATX1) and enhancer of zeste (CLF) establish “bivalent chromatin marks” at the silent AGAMOUS locus. Nucleic Acids Research **35**: 6290–6296.

Steward FC, Mapes MO, Mears K. 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. The American Journal of Botany **45**: 705–708.

Takebe I, Labib G, Melchers G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften **58**: 318–320.

Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette M-L, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G, Colot V. 2007. Arabidopsis TFL2/LHP1 Specifically Associates with Genes Marked by Trimethylation of Histone H3 Lysine 27. PLOS Genetics **3**: e86.

van Dijk K, Ding Y, Malkaram S, Riethoven J-JM, Liu R, Yang J, Laczko P, Chen H, Xia Y, Ladunga I, Avramova Z, Fromm M. 2010. Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology **10**: 238.

Williams L, Zhao J, Morozova N, Li Y, Avivi Y, Grafi G. 2003. Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. Developmental Dynamics **228**: 113–120.

Wollmann H, Holec S, Alden K, Clarke ND, Jacques P-É, Berger F. 2012. Dynamic Deposition of Histone Variant H3.3 Accompanies Developmental Remodeling of the Arabidopsis Transcriptome. PLOS Genetics **8**: e1002658.

Yadav RK, Girke T, Pasala S, Xie M, Reddy GV. 2009. Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. Proceedings of the National Academy of Sciences **106**: 4941–4946.

Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM. 1999. Regreening of senescent Nicotiana leaves II. Redifferentiation of plastids. The Journal of Experimental Botany **50**: 1683–1689.

Zhao J, Morozova N, Williams L, Libs L, Avivi Y, Grafi G. 2001. Two Phases of Chromatin Decondensation during Dedifferentiation of Plant Cells DISTINCTION BETWEEN COMPETENCE FOR CELL FATE SWITCH AND A COMMITMENT FOR S PHASE. The Journal of Biological Chemistry **276**: 22772–22778.

Zhu J-K. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. Annual Review of Plant Biology **53**: 247–273.

[**Stress som en direkt inverkan på dedifferentiering i somatiska växtceller**]: etisk bilaga

Ida Brisvåg Perman

Självständigt arbete i biologi 2016

Etik

Det här arbetet undersöker om stressfaktorer såsom torka, ljusbrist, värme och angrepp påverkar mogna växtceller att genomgå en process som kallas dedifferentiering. Cellen nermonterar strukturer och får stamcellsegenskaper, det vill säga kan utvecklas till ett stort antal celltyper. Processen har studerats på laboratorier där celler med rätt behandling kan genomgå detta, men det här arbetet vill se om det även kan ske utanför labb, i naturen, och då hur stressfaktorer kan påverka initieringen av processen.

Relevans till syftet

Avsikten med arbetet är att om stress kan kopplas som en faktor kan det vara viktig kunskap för anpassning av växter för agrikultur. Jag försöker alltså sätta någonting som studeras *in vitro*, i klinisk miljö, i relation till hur det kan appliceras *in vivo*, ute i världen. Dock studerar jag endast en stressaspekt åt gången. I naturen utsätts växter för olika kombinationer av stress och faktorer som påverkar deras tillväxt och anpassning. Det man kan fråga är om den här typen av undersökning faktiskt kan säga någonting om hur växtceller reagerar i sin naturliga miljö, då testen är gjorda i en optimal miljö.

Jag anser att det inte är helt korrekt att dra slutsatser om hur mina resultat kan användas i fält, eftersom jag inte kan veta hur olika miljöförhållanden kan påverka resultaten. Dock tycker jag det är ett rimligt förhållande att undersöka. Även om kunskapen inte är direkt applicerbar så kan den användas för djupare förståelse för cellanpassningar, och kan användas i andra typer av försök.

Etiska aspekter av tidigare framtagen information

Studien behandlar växter och visar på växtstudier av dedifferentiering istället för studier på djur. Dels som en effektivare metod och dels en metod som inte leder till lidande hos djur eller människor. Dock lutar sig referensartiklar till stora delar på forskning gjord på djur, exempelvis amputerandet av lemmar på salamanderlarver. Är andrahandsanvändare av informationen fri från det etiska bedömandet kring hur informationen hämtades? Är jag som tredjehandsanvändare fri från den bedömningen?

Jag har möjligheten att inte inkludera resultat som jag anser bygga på dålig djuretik. Det som är svårt är att spåra vilken etikdiskussion som föregått experimentet, särskilt om det var en studie gjord för ca 30 år sedan. Men jag anser inte att jag är fri från bedömningen ens som tredjehandskälla och i fortsättningen vill jag ta mig tiden att undersöka om djurets lidande stått i proportion till vinsten.

När det kommer till dedifferentiering av djurceller, där skadade celler och vävnad kan återbildas, är det ett viktigt ämne inom medicinen, varför det finns så mycket forskning gjort på området. Salamandrar är också vanligt förekommande i sådana experiment eftersom det uppvisar en väldigt god förmåga till att återskapa förlorad vävnad och till och med lemmar, någonting som de använder i sitt naturliga tillstånd. Eftersom lemmen växer tillbaka kan man argumentera att salamandern inte utsätts för ett altförs stort övergrepp, men proceduren orsakar djuret lidande som det inte hade utsatts för annars. Ett par lemlästade salamandrar kan bidra till stora framsteg inom medicin vilket skulle minska lidandet för många människor och djur, så med konsekvensetiskt tänk är det tänkbart om man inte utför mer försök än nödvändigt. Om man

ser på det ur ett pliktetiskt perspektiv så har salamandrar rättigheter. De har bedömts som kännande varelser och har därmed rättigheter till att inte plågas, oavsett vilka vinster som kan göras från detta. I mångt och mycket kommer det ner till hur vi värderar människor gentemot salamandrar och väger vikten av deras lidande. Jag anser att vi måste ha respekt för att vi hanterar levande varelser och inte verktyg eller leksaker. Använder vi dem så bör vi minska lidandet så mycket som möjligt och bedöma vad som faktiskt kan vinnas av dessa ingrepp. Djurens förtjänar vår respekt, särskilt dem vi utsätter för lidande för att vårt eget lidande ska minska.

Forskningsetik

I ett smalt spår som det här finns bara ett visst antal artiklar som direkt tar upp samma frågeställning. Av dessa så var det samma författare som cirkulerade och som refererade till varandra. Det finns en risk med att huvuddelen av artikeln i mångt och mycket är baserat på en mindre grupp forskare som alla arbetar tillsammans till en viss gräns. Denna grupp väljer att lägga fokus mot en viss riktning, och det innebär att andra tolkningar och mer informativa försök kan missas. Jag har gått genom källor som de baserat några av sina slutsatser på och försökt att se på dem utan att färgas av andra författares tolkningar av informationen. Jag har även valt att inte dra vissa slutsatser som forskargruppen gjorde eftersom jag inte kunde ta till mig informationen på ett tillfredsställande sätt och inte ville ta en mindre grupps ord för att så var fallet.