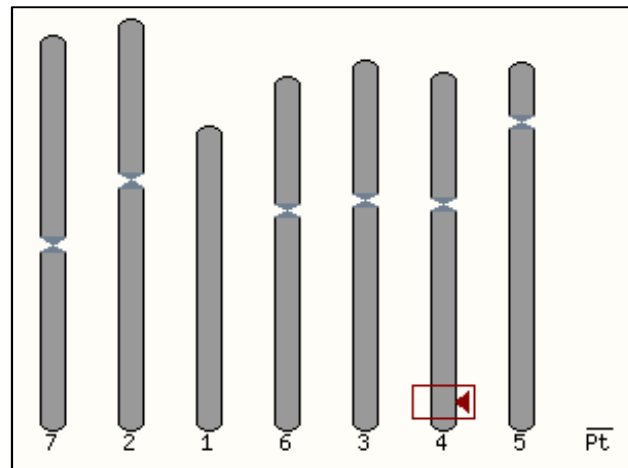


ZÁRÓJELENTÉS

OTKA PD 112103 sz. pályázat

A project kutatási programjának célja hidegindukált árpa D4 annexinek vizsgálata volt annak érdekében, hogy a génstruktúra elemzésére, az expressziós profil elemzésére, a fehérje funkcionális vizsgálatára, illetve sejten belüli elhelyezkedésének meghatározására alapozva megerősítse ezeknek a faktoroknak a feltételezett szerepét, illetve meghatározza specificitásukat, a gabonafélék abiotikus stressz-válaszaiban betöltött speciális szerepüket. A project 2015 február 1-jén indult, az első év során a későbbi kísérletes munka megalapozását célzó módszerbeállítások, illetve a kiindulási anyagok előállítása történt meg.

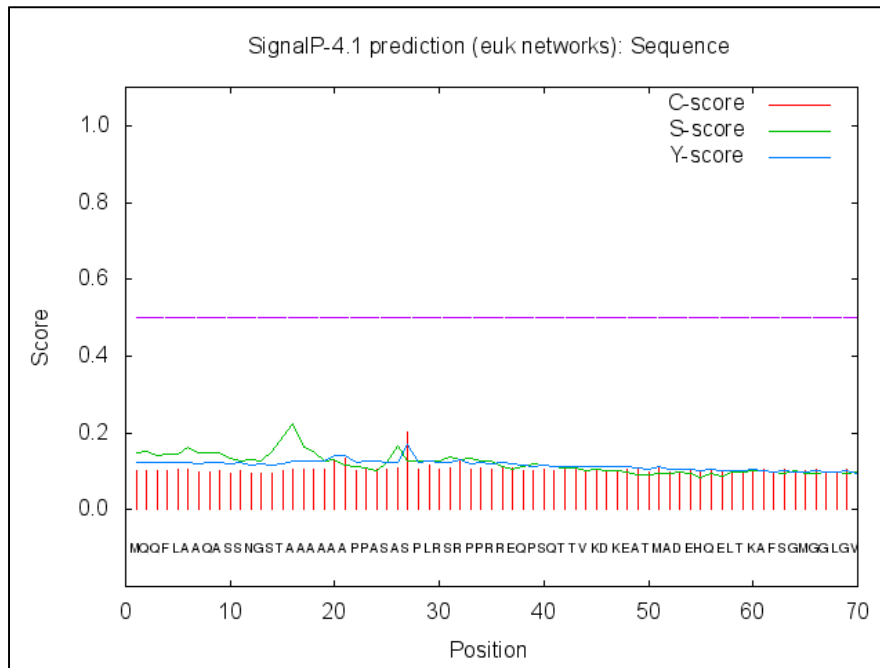
Korábbi kísérleteink során, hideg hatására megváltozott génexpressziós működést mutató árpa microarray próbák segítségével már azonosítottunk egy feltételezhetően D4 annexin fehérjét kódoló, teljes CDS szekvenciát. Emellett a D4 annexinek konzervált domainjeinek (smart00335 domain és pfam00191 annexin repeat), valamint az ismert *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon* és *Oryza sativa* D4 annexin gének adatait keresőszekvenciaként felhasználva az összes feltételezhető árpa D4 annexin ortológ szekvenciárészletet kigyűjtöttük nem átfedő EST és genomi szekvenciák közül nemzetközi elektronikus adatbázisokból (NCBI GenBank, Gramene) *in silico* módszerek (BLAST, BLAT, Contig Assembly) alkalmazásával. Ezekből konszenzus szekvenciákat, valamint összeillesztéseket készítettünk további keresések lefolytatása, a teljes génszekvencia meghatározása céljából. A keresések eredményeként egy eddig ismeretlen funkciójú, még nem jellemzett gént sikerült azonosítani mint az árpa lehetséges D4 annexin génjét. A szekvenciaadatok alapján megállapítottuk, hogy a gén az árpa IV. kromoszómájának hosszú karján helyezkedik el (1. Ábra).



1. **Ábra:** A feltételezhető D4 annexin gén kromoszomális lokalizációja árpaiban (Gramene BLAST).

A microarray próbákkal végzett homológiakeresés segítségével a 3' UTR elméleti szekvenciáját is sikerült *in silico* azonosítani, az általunk használt őszi árpa genotípusban megtalálható gén teljes, valós cDNS transzkript szekvenciájának pontos meghatározásához azonban laboratóriumi munka, 3' és 5' RACE módszer használata szükséges. A kromoszóma szekvenciaadatai alapján a promóter régiót is behatároltuk, azonban mivel az árpa genom szekvencia-összeillesztése még közel sem teljes, sok helyen tartalmaz bizonytalan szakaszokat, ennek pontos meghatározásához a gén kódoló régiójából kiinduló, több lépéses, inverz PCR módszert követő szekvenálás alkalmazása szükséges.

Az azonosított, 1092 bázispár hosszúságú kódoló szekvenciát tartalmazó gén egy 363 aminosavból álló, 39,94 kDa tömegű fehérjét kódol, melynek az elméleti izoelektromos pontja (pI) 9,2. Motívumalapú szekvenciaelemző eszközök és adatbázisok (MEME, MAST, PLACE, EMBL-EBI, InterPro, PROSITE, SMART) használatával, a gén *in silico* analízise során három funkcionális annexin domaint azonosítottunk a gén középső és 3' végéhez közeli régiójában. Speciális szignál peptid, szekréciós irányító jel jelenlétét nem lehetett kimutatni a szekvenciában (2. Ábra), ami citoplazmás lokalizációra enged következtetni. Intron szakaszokat sem tartalmaz a gén, az *in silico* analízis szerint egy hasítási (splice) variánsa van, ami megkönnyíti a klónozást és a géntermék működésének vizsgálatát.



2. Ábra: Az árpa feltételezhető D4 annexin génjének szignálpeptid profilja (SignalP).

Az őszi árpából klónozott gén fehérjetermékének biológiai szerepét bizonyító komplementációs vizsgálatokhoz az *Arabidopsis* D4 annexin gén szekvenciájának ismeretében kiválasztottunk három T-DNS inszerciós mutáns SALK vonalat is a későbbi kísérletes munkához.

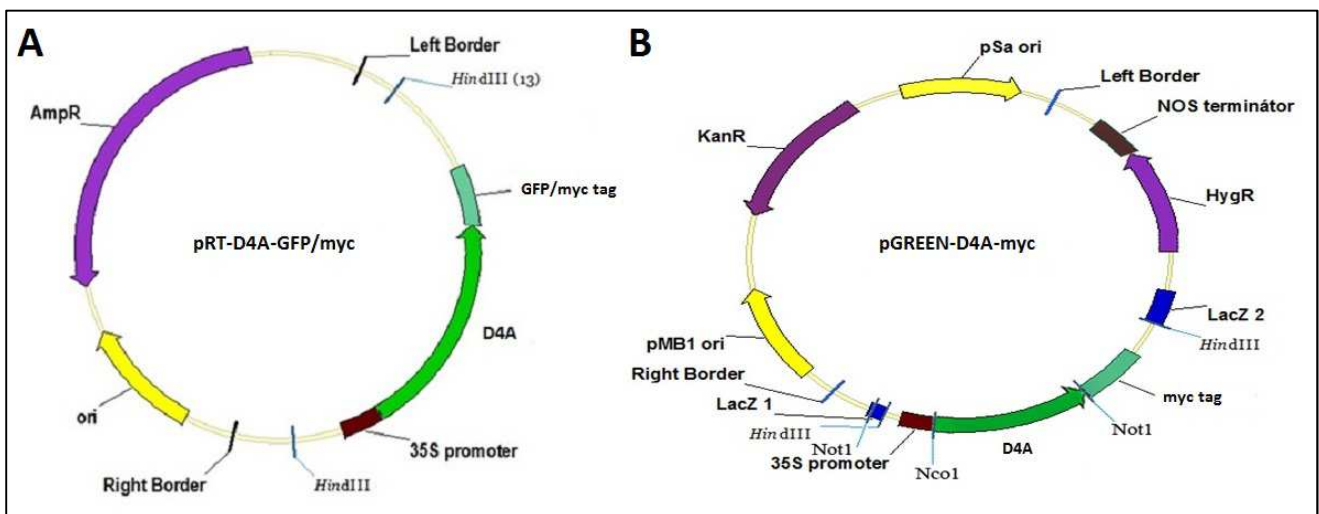
A konzervált régiók vizsgálatával, homológiakeresés alapján azonosított árpa D4 annexin gén kódoló régióját RT-PCR módszerrel (high-fidelity DNS polimeráz használatával) klónoztuk *Hordeum vulgare* cv. *Nure* őszi árpa genotípusból, és az izolált génszakaszt szekvenáltuk a pontos bázisrend meghatározása céljából. Ennek során pontmutációs eltéréseket (báziscseréket) találtunk az adatbázisokban közölt nukleinsav szekvenciákhoz képest, amik azonban nem okoznak aminosav-változást a fehérjeszekvenciában, és feltehetően az eltérő árpa fajták genotípusos különbségeiből adódnak.

Ezt követően a gént expressziós vektorokba építettük. Rekombináns DNS technikával, fúziós konstrukciók előállításával C-terminális tag-eket (funkciós egységeket) kapcsoltunk a vizsgált fehérjéhez. Az elkészített konstrukciók helyességét PCR módszerrel, specifikus restrikiós emésztésekkel és szekvenálással is ellenőriztük.

Elkészítettük a modellnövény stabil transzformációjához szükséges konstrukciókat *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített génátvitelre alkalmas, bináris pGREEN vektor-rendszerben. A fehérjét itt myc tag-gel láttunk el, hogy képződésüket Western immunoblot

technikával, a myc epitóphoz kötődő monoklonális anti-myc ellenanyag segítségével nyomon tudjuk majd követni a transzformáns növényekben. A géntermék intracelluláris lokalizációjának meghatározásához különálló sejteket tartalmazó protoplaszt kultúrák vizsgálatát terveztük konfokális lézermikroszkópiás eljárással, amihez gyorsabb, kíméletesebb tranziens transzformációs módszert (PEG-kezeléssel történő, ideiglenes vektorbevitelt) társítottunk. Ehhez kisebb, kémiai módszerrel könnyebben bevihető pRT vektorban készítettünk a lézermikroszkópiás vizualizálás szempontjából fontos GFP-jelölt, illetve a protoplasztból történő fehérjekimutatás céljából myc taggel ellátott fúziós fehérjekonstrukciókat.

Mindkét típusú vektor expressziós kazettáját úgy készítettük el, hogy konstitutív 35S promotert és NOS terminátor egységet tartalmazzon. A bakteriális szelekciót ampicillin, illetve kanamycin, a növényi transzformációt követő szelekciót hygromycin markergén beépítésével biztosítottuk (3. Ábra). Készítettünk célgént nem tartalmazó, kontroll konstrukciókat is. A vektorokat kémiai kompetens *E. coli* törzsben szaporítottuk fel.

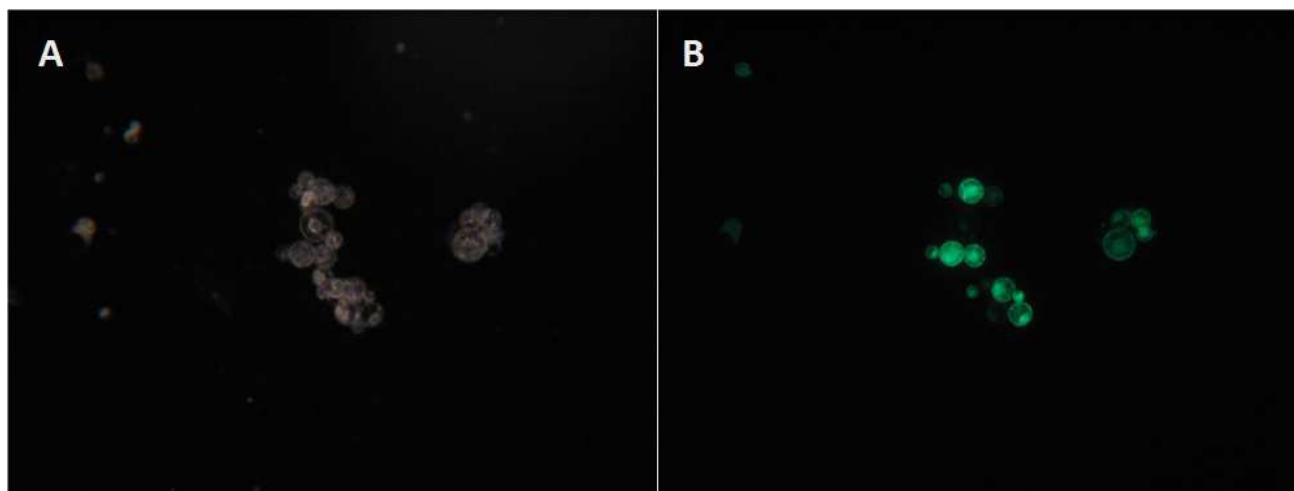


3. Ábra: A protoplaszt kultúrák tranziens transzformációjához (A), illetve a növények *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített, stabil transzformációjához (B) készített vektor konstrukciók sematikus ábrája (Vector NTI).

Ezen felül az első évben megtörtént a növényi transzformációhoz használni kívánt *Agrobacterium tumefaciens* törzs alkalmasságának és transzformációs kompetenciájának ellenőrzése kontroll (célgént nem tartalmazó) plazmid, valamint az elkészített pGREEN-alapú konstrukciók hősokk-kezeléssel történő bejuttatását követő, PCR alapú és szekvenálós ellenőrzésével, melynek során a bináris konstrukció működéséhez szükséges helper plazmid (pSOUP) meglétét is ellenőriztük a kultúrákban.

Annak érdekében, hogy a vizsgált fehérje sejten belüli lokalizációját később meg tudjuk határozni, speciális növényi sejttenyészetet, kloroplasztiszokat nem tartalmazó protoplaszt kultúrákat is elő kellett állítani. Erre egyrészt azért volt szükség, mert a lokalizációs vizsgálatoknál használni kívánt, fluoreszcens jel detektálásán alapuló konfokális lézermikroszkópiás módszer használatát zavarja a kloroplasztiszok autofluoreszcenciája, másrészt a hatékony tranziens transzformációhoz sejtfal nélküli növényi sejtekre van szükség.

Mivel a növényi szövet- és sejttenyésztési rendszerek sikeres beállításánál olyan apró részletek is számítanak mint például az üvegeszközök formája, lezárási módja vagy a tápoldat mozgatásának, rázásának pontos paraméterei, amelyre vonatkozó információkat nem mindig közölnek kellő részletességgel a szakcikkekben, a munka megkezdése előtt felvettem a kapcsolatot a téma nemzetközileg elismert, tapasztalt szakértőjével, Dr. Szabados Lászlóval (MTA SZBK), aki hasznos tanácsokkal látott el. Így sikerült már publikált protokollokból kiindulva a martonvásári kutatóintézetben is beállítani egy olyan szövettenyésztési rendszert, melynek segítségével elő lehet állítani steril körülmények között nevelt, intakt *Arabidopsis* növények gyökeréből megfelelő minőségű, életképes, jól transzformálható protoplaszt kultúrákat (4. Ábra). Ez azért volt fontos előrelépés, mert korábban külső kutatócsoporttól kapott, kész protoplaszt kultúrákat használtunk a kísérletekhez, amik viszont csak a vad (Col-0) genotípusból álltak rendelkezésre. A módszer meghonosításával viszont már magunk is elő tudunk állítani bármilyen - akár mutáns vagy transzformáns vonalból is - protoplaszt kultúrát, ami nagyon fontos a további kutatások szempontjából.



4. Ábra: Kontroll pRT-GFP konstrukcióval transzformált *Arabidopsis thaliana* protoplaszt sejtek natív felvételen (A), illetve UV megvilágítás hatására fluoreszcens jelet emittálva (B) (Olympus BX51 fluoreszcens mikroszkóppal készített felvétel). A natív és a fluoreszcens kép alapján kapott sejtszámok arányából következtetni lehet a transzformációs hatékonyságra (az ábrán szereplő kultúrában ez 52 % volt).

Munkámat azzal folytattam, hogy ezt a rendszert egyszikű növényre (a gabonafélék modellnövényének tekinthető diploid árpara) is kidolgozzam. Korábbi kutatásaim során már többször sikeresen állítottam be árpa szövet- és sejttenyészeti rendszereket, ez azonban mindig hosszabb folyamat, mint a kétszikű modellnövény esetében. Ennek egyrészt az az oka, hogy kevesebb irodalmi adat érhető el a témában, és az alapvetően kétszikű rendszerekben használt szintetikus hormonanalógok típusa, koncentrációja, leírt kombinációja kisebb sikerrel alkalmazható egyszikűekben, a táptalajok, tápoldatok összetételét és a nevelési körülményeket gabonafélék esetében legtöbbször genotípusra vonatkozóan is optimalizálni, módosítani kell. Másrészt az *Arabidopsis* és a gabonafélék életciklusának hossza, növekedési ritmusa eltérő, utóbbiaknál ezért tovább tart a kiindulási anyagok előállítása. Ezen felül az eltérő sejtfalszerkezet miatt a protoplasztálás protokolljában is változtatásokat kell eszközölni az enzimmösszetételre, illetve az inkubációs idő optimális hosszára vonatkozóan (a túl rövid inkubációs idő elégtelen sejtfallebontást, a túl hosszú viszont a sejtek életképességének, valamint a transzformációs hatékonyságnak a csökkenését eredményezi). Ez a munka az első év során a kiindulási anyag szövettenyésztésének beállításáig és a protoplasztálás protokolljának hatékonyságnövelő optimalizálásáig jutott.

Munkahelyváltás miatt azonban 2015. december 31. napjával munkajogviszonyom megszűnt a Magyar Tudományos Akadémiával, már nem vagyok az Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Növényi Molekuláris Biológia Osztály dolgozója, más tudományterületen,

tevékenységi körben dolgozom. Ebből adódóan nem tudtam vállalni a pályázat vezetését a második és harmadik projectévre, ezért kérvényeztem a pályázat idő előtti lezárását, amihez az NKFI Hivatal kutatás-fejlesztésért felelős elnökhelyettese szíves hozzájárulását adta.

Az első projectévre vállalt feladatokat teljesítettük, az ennek keretében végzett módszerbeállítások, előállított anyagok, kapott eredmények viszont elsősorban a következő projectévekre tervezett kísérletes kutatómunka megalapozását segítették elő, önmagukban nemzetközi konferencián, tudományos szakfolyóiratokban történő bemutatásra nem alkalmasak. Ezért a projecthez kapcsolódó első éves munkából nem született a publikációs adatbázisba feltölthető közlemény. Mindazonáltal a beállított módszerek, illetve az elkészített szövet- és sejtenyészeti rendszerek, valamint az expressziós konstrukciók továbbra is elérhetőek, hasznosíthatók a martonvásári kutatóintézetben. Fontos eredménynek tekintem, hogy a projectben résztvevő MSc hallgatóm, Ahres Mohamed elméleti és módszertani képzéséhez nagyban hozzájárult az, hogy közreműködhetett a project kidolgozásában. Hallgatóm várhatóan 2016 szeptemberében kezdi meg PhD tanulmányait, melynek során a K 111879 sz. OTKA pályázat (cím: Gabona és lombhullató fás növények fagyállóságának fény és hőmérséklettől függő molekuláris szintű szabályozása; vezető kutató: Dr. Galiba Gábor) kidolgozásában fog részt venni, hasznosítva a jelen pályázathoz kapcsolódó kutatómunka során szerzett tudását, tapasztalatait.

Kelt: Budapest, 2016. február 22.

Dr. Vashegyi Ildikó
vezető kutató