

Zárójelentés

a K109719 számú

"A gabonafélék új modellnövénye, a szálkaperje gyökerében zajló szervfejlődési és sejtsztódási folyamatok kapcsolata"

című OTKA kutatási pályázatról

A pályázat forrásaiból végzett kutatásokból elkészült egy PhD disszertáció, kettő kizárólag a pályázatra épülő és egy, részben a pályázatra épülő bírált, impakt-faktoros tudományos közlemény, valamint nagyszámú előadás-absztrakt és konferencia-poszter.

Továbbá két már elkészült kézirat vár még leközlésre, és a sejtszinkronizációs és foszforilációs munkák folytatásával legalább egy-egy közleményt remélünk a jövőben, e pályázat során végzett kutatásainkra alapozva.

A magasabb rendű edényes növények struktúrája leegyszerűsítve a hajtástengelyből, a róla elágazó oldalhajtásokból, az azokon fejlődő vegetatív és generatív szervekből, valamint a központi gyökérből és az oldalgyökerekből épül fel. E szervek létrehozása szinte teljes egészében posztembrionálisan megy végbe – vagyis a növények a magasabb rendű állatoktól eltérő módon teljes életciklusuk alatt képesek új szervek, szövetek létrehozására. Ez a kivételesen rugalmas egyedfejlődési program nemcsak bámulatos formagazdagságot és folyamatos növekedést tesz lehetővé, de egyben az állandóan változó környezethez történő alkalmazkodás záloga is a szesszilis életmódot folytató növények számára.

A növények lenyűgöző plaszticitása két forrásra vezethető vissza: egyrészt a pluripotens osztódóképes szöveti régiók (merisztémák) aktivitása, másrészt a már differenciálódott sejtek azon képessége, hogy bizonyos körülmények között visszanyerhetik pluripotenciájukat – biztosítja a növényekre jellemző nyitott, folyamatos növekedésre képes egyedfejlődési programot. A pontos és arányos szervfejlődés szempontjából ugyanakkor a növények esetében is nélkülözhetetlen a sejtek osztódásának és az utódsejtek differenciációjának korrekt időbeli és térbeli szabályozása. Ebben a folyamatban kiemelt jelentőséggel bír a merisztémák és a fejlődő új szerv közötti határ kijelölése. Jelenlegi ismereteink szerint ez a határ nem egyfajta filozófiai „vagy merisztéma vagy fejlődő szerv” szélsőséges állapota közötti döntést jelenti, hanem sokkal inkább egy jól definiálható, specializált sejtek alkotta diszkrét fizikai választóvonal. A határvonalat meghúzó sejtek nemcsak a merisztematikus szöveti régiók pluripotenciájának

fenntartásához szükséges mikrokörnyezet behatárolásához szükségesek, hanem az osztódó szövetek és a belőlük fejlődő szervprimordiumok közötti kapcsolat fenntartása szempontjából is nélkülözhetetlenek. A határoló sejtek környezetüktől markánsan eltérő génexpressziós mintázattal jellemezhetők: ilyen jellegzetes, csak a határoló sejtekben aktív gének pl. a CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC), PETALLOS (PTL) vagy a BLADE ON PETIOLE (BOP) transzkripciós faktorokat kódoló gének. Az itt működő egyedi transzkripciós faktorok közötti bonyolult kapcsolatrendszer koordinálja a merisztematikus sejtek osztódását és az utódsejtek differenciációját.

Ilyen, az oldalszervek képződési helyén, a merisztémák a primordiumok határán kifejeződő génként írták le az első LOB-domain transzkripciós faktort (LBD) kódoló gént, mintegy 15 évvel ezelőtt, lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) végzett ún. „enhancer trapping” kísérletek eredményeként. Az elnevezés is ebből a speciális kifejeződési mintázatból ered: LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) – vagyis „oldalszervek határán működő”, „oldalszervek határát kijelölő” gén. Az általa kódolt fehérje funkciója bár akkor még teljesen ismeretlen volt, annyit meg lehetett jósolni, hogy N-terminálisán tartalmaz egy 100 aminosav hosszú szerkezeti motívumot, a LOB-domain (DUF260 – domain of unknown function), mely három szerkezeti elemből épül fel: tartalmaz egy négy ciszteinből álló „C-blokk” egységet (CX₂CX₆CX₃C), mellette egy központi glicin-alanin-serin motívummal rendelkező „GAS-blokkot” és egy leucin-zipper jellegű motívumot (LX₆LX₃LX₆L). Az eddigi vizsgálatok alapján a C-blokk felelős a DNS-kötő aktivitásért, a leucin-zipper jellegű szelvény pedig fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását teszi lehetővé. Maga a LOB-domain motívum 42 további *Arabidopsis* fehérjében is megtalálható; és egy meglehetősen konzervált, viszonylag népes (fajonként átl. néhány tucat gént tartalmazó), a *Charophyta* algáktól kezdve a zárvatermőkig minden vizsgált növényben előforduló transzkripciós faktor-családról van szó. Mivel LOB-domainnel vagy hasonló szerkezeti motívummal rendelkező fehérjét növényi adatbázisokon kívül eddig sehol sem találtak, az ide tartozó fehérjék kétséget kizáróan növényekre specifikus folyamatokban vesznek részt.

A LOB-domain transzkripciós faktorok által irányított folyamatok döntő többsége szervfejlődés irányításával kapcsolatos. A felfedezésük óta már sokrétűen igazolták, hogy az oldalszervek határának kijelölésén túl a legkülönbözőbb szervfejlődést érintő folyamat irányításában részt vesznek, mint pl. fotomorfo-genetikus folyamatok, levélmorfológia meghatározása, oldalgyökök képződése, virágfejlődés, mikrosporogenezis, kalluszképződés

és *in vitro* regeneráció. Egy-egy LBD transzkripció faktor egyszerre több különböző szerv fejlődési folyamatait is irányíthatja, és gyakori, hogy ezeket a feladatokat más-más LBD transzkripció faktorokkal kombinációban látják el. Sokrétű funkciójuk ellenére úgy tűnik, hogy az LBD fehérjék általánosságban külső környezeti jelek és növényi hormonok (pl. auxin, citokiniek, brassinoszteroidok) jelentette belső szignálok fejlődési programmá történő „lefordításában” játszanak nélkülözhetetlen szerepet. Bár ennek mechanizmusa és a háttérben álló molekuláris hálózatok még kevésbé ismertek, az eddigi kutatási eredmények arra engednek következtetni, hogy az LBD transzkripció faktorok a sejtciklus szabályozásával szoros összefüggésben határozzák meg egy-egy szerv megfelelő fejlődését. LBD gének rendellenes működése miatt kialakuló abnormális fenotípusok számos esetben járnak együtt sejtosztódási és differenciálódási hibákkal. Néhány eklatáns példa: a lúdfű AtLBD6 hiányában fellépő aszimmetrikus levélmorfológia az adaxiális/abaxiális szimmetriatengelyt kialakító sejtek dedifferenciációjának és fokozott proliferációjának köszönhető, míg kukoricában (*Zea mays*) megtalálható orthológja, a ZmIgl1 (Indeterminate gametophyte1) hiánya egyebek mellett a termőtáj rendellenességeit idézi elő (extra szinergida sejtek megjelenése és több petesejt a termőben), ami a magkezdemény osztódási fázisának kitolódásával magyarázható. Szintén lúdfűből ismert az AtLBD27/SCP (SIDE CAR POLLEN), mely a mikrospóra sejtek osztódásának időzítését és a sejtek osztódásának irányát is megszabja.

Arra vonatkozóan, hogy a LOB-domain transzkripció faktorok miként kapcsolódnak be a sejtciklus szabályozásának jól ismert folyamatába, kevés ismeret áll rendelkezésünkre. A sejtosztódás és az LBD transzkripció faktorok közvetlen kapcsolatára utalnak munkacsoportunk eddig még nem publikált eredményei: élesztő két-hibrid (Y2H – yeast two hybrid) rendszerben végzett kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a lucerna (*Medicago sativa*) egyik A2 típusú ciklinjének kölcsönható partnere egy LBD fehérje, az MtCPP1 (cyclin partner protein1). Ugyan a közel 20 évvel ezelőtti kutatás célja a lucerna A2 ciklin kölcsönható partnereinek felderítése volt, néhány évvel ezelőtt figyelmünket a LOB-domain transzkripció faktorokra irányította.

Célkitűzések

Az LBD gének, köszönhetően szervfejlődésben betöltött sokrétű szerepüknek, az utóbbi évek intenzívebben tanulmányozott génjei közé kerültek. Megismerésük lehetőséget nyújt nemcsak a merisztémák és a fejlődő szervek határán működő molekuláris mechanizmusok mélyebb megértéséhez, de minél több fajra kiterjedő átfogó vizsgálatuk a növényi

egyedfejlődés evolúciójába is betekintést enged. Ezzel együtt az LBD génekre vonatkozó ismereteink jelentős része lúdfűvel végzett kutatások eredményeire támaszkodik, más növényfajokban, így egyszikűekben megtalálható LBD génekről kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Munkánk során egyik célunk éppen ezért a gén család átfogó feltérképezése volt szálkaperjében (*Brachypodium distachyon*), mint kalászos gabonaféléink modellnövényében. Ezzel kapcsolatban három lényeges célkitűzésünk volt:

- Az LBD transzkripciós faktorokat kódoló gének azonosítása a szálkaperje genomjában.
- Az azonosított LBD transzkripciós faktorok részletes filogenetikai analízise, rokonsági kapcsolatainak vizsgálata más fajokban már azonosított LOB-domain transzkripciós faktotokkal.
- A szálkaperje LBD transzkripciós faktorait kódoló gének szerv-specifikus kifejeződésének vizsgálata, részletes expressziós profil készítése és a kapott mintázatok összehasonlítása más növényfajok LBD géneinek már ismert kifejeződésével.

Bár konkrét bizonyítékokkal még nem támasztották alá, az eddigi kutatások alapján úgy tűnik, a LOB-domain transzkripciós faktorok a sejtosztódási és differenciálódási folyamatok határán teremtenek egyensúlyt. A továbbiakban a szálkaperje azonosított LBD génjei között két olyan génre fókuszáltunk, melyek a legnagyobb homológiát mutatták a *Medicago truncatula* már említett MtCPP1 génjével. Korábbi vizsgálataink tanulsága alapján az MtCPP1 által kódolt LOB-domain transzkripciós faktor kölcsönhatásban állhat a *Medicago* A2 típusú mitotikus ciklinjével. Tekintettel arra, hogy a *Medicago* A2 ciklinje bizonyítottan szerepet játszik a gyökér periciklus sejtjeinek reaktiválásában, kapcsolata az LBD transzkripciós faktorokkal meghatározó lehet a gyökérfejlődés szempontjából. Kíváncsiak voltunk arra, hogy hasonló kapcsolatok lehetnek-e szálkaperjében is? Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatához kapcsolódó célkitűzésünk az alábbi volt:

- A *Medicago* A2 ciklin szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológia és a *Medicago* MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjai közötti kölcsönhatás tesztelése élesztő két-hibrid rendszerben.

Anyagok és alkalmazott módszerek

A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak in silico vizsgálatához kapcsolódó módszerek

A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak beazonosítása céljából kétféle megközelítést alkalmaztunk: első megközelítésben a lúdfű már ismert LOB-domain transzkripciós faktorainak aminosav-szekvenciáit használtuk fel referenciaként a szálkaperje teljes proteomjával (Phytozome v12 portál – <http://phytozome.org>, *Brachypodium distachyon* v3.1 adatbázis) szembeni átfogó BLAST analízishez. Második lépésként a Pfam (<http://pfam.xfam.org>) és a SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) szekvencia-elemző portálok segítségével beazonosítottuk a BLAST keresés eredményeként kapott szekvenciákban a konzervált szekvencia-motívumokat. Végeredményben azokat a fehérjéket tekintettük egyértelműen LBD transzkripciós faktornak, melyek a Pfam adatbázis PF03195 (DUF260) családjába sorolódtak konzervált motívumaik alapján.

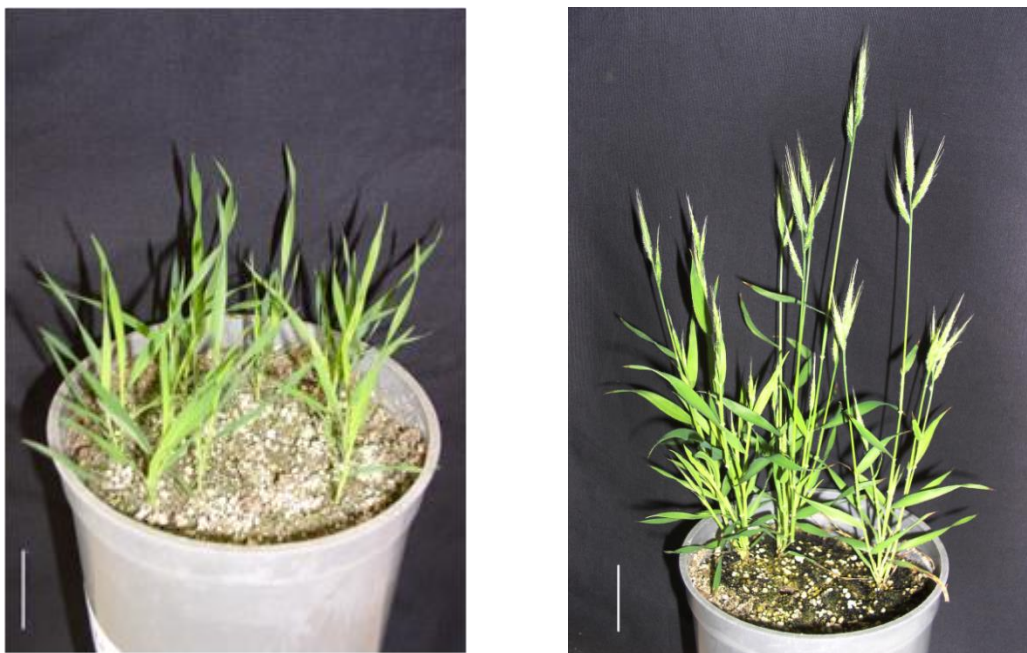
A kapott szekvenciák filogenetikai analízisét a MEGA6 szoftver (<http://www.megasoftware.net/>) segítségével végeztük el (BLOSUM62 szubsztitúciós mátrix, Neighbour Joining módszer), a beazonosított szálkaperje LBD fehérjék konzervált, LOB-domain motívumát reprezentáló aminosav-szekvenciákra korlátozva. Az előbbiekkal azonos módon megvizsgáltuk a szálkaperjében azonosított LBD transzkripciós faktorok és más fajokból már ismert LBD transzkripciós faktorok közötti filogenetikai kapcsolatokat is, melyhez a szálkaperje mellett a kukorica (*Zea mays*), a rizs (*Oryza sativa*) és a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) LBD transzkripciós faktorainak konzervált domain-motívumát reprezentáló aminosav-szekvenciáit használtuk fel.

A szálkaperje teljes genomjának szinténia-analízise és génduplikációs eseményeinek vizsgálata a Plant Genome Dupplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication>) adatai alapján készült.

Az LBD gének expressziós profiljának vizsgálatához kapcsolódó módszerek

A génexpressziós vizsgálathoz a nagy pontosságú, megszekvenált genommal bíró Bd21-es szálkaperje ökotípus növényeit használtuk. A magokat 4 napos sztratifikálást követően homok:perilt 2:1 arányú keverékébe ültettük. A növényeket kontroll körülmények között, növénynevelő kamrában neveltük a mintavétel időpontjáig (fotoperiódus: 18 h megvilágítás/ 6 h sötét; fényerősség: $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; hőmérséklet: 21-22 °C; relatív páratartalom: 60-65%; normál vízellátottság: a nevelőközeg 80% víztartalmáig, a mintavétel időpontjáig minden nap Hoagland tápoldattal locsolva - a neveléshez használt homok:perlit relatív 100%-os

vízkapacitása 260-265 g/kg). Összesen 37 különböző növényi részből gyűjtöttünk mintát, sztereomikroszkóp segítségével: 25 növényi részt 14 napos, négy leveles állapotú, vegetatív stádiumú növényekből (6 különböző gyökérszegmens, 5 hajtásnódusz, 2 internódium, 4 különböző fejlettségi állapotú levél és reészei: levéllemez, levél ligula, levélhüvely) gyűjtöttünk be, 9 növényi rész 28 napos, generatív stádiumú növényből származott (zászlóslevél lemeze, a virágzat különböző részei, 3 eltérő fejlettségi állapotú virág, portok), 3 minta (3 eltérő fejlettségi állaoptú termés) 40-45 napos növényből került begyűjtésre. Megközelítőleg 200 növény került felboncolásra az RNS izoláláshoz szükséges 50-100 mg-nyi növényi anyag begyűjtéséhez az egyes mintákból.



1. ábra. A) 14 napos *Brachypodium distachyon* növények; B) 27-28 napos, virágzó *Brachypodium distachyon* növények. (A növények kora a csírázástól eltelt időt jelöli.) A fehér vonal 2 cm-t jelöl.

A szálkaperje LBD génjeinek relatív transzkript mennyiségeit az egyes LBD génekre tervezett specifikus primerek segítségével, két referenciagén kifejeződéséhez viszonyítva, valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) módszerrel határoztuk meg. Ehhez az egyes növényi részekből izolált totál RNS tartalomból cDNS templát készült. A transzkript mennyiségek detektálása ABI Prism 7900-HT Fast Real-Time készülékkel történt, sztenderd beállításokkal.

Az élesztő kettős hibris vizsgálatokhoz kapcsolódó anyagok és módszerek

A korábbi kísérletek alapján kölcsönható partnernek bizonyuló *Medicago truncatula* MtCPP1 (MTR_5g083960) és *Medicago sativa* MsA2;2 ciklin (CAB46083 – a továbbiakban

MsCYC-A2) szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjait TBLASTX analízissel azonosítottuk be, a szálkaperje genom adatbázisával szembeni kereséssel. Az analízis alapján a szálkaperje egyetlen A2 típusú ciklinjét (Bd4g06827 – a továbbiakban BdCYC-A2) és két LBD transzkripciós faktort kódoló génjét (Bd2g34520 – a továbbiakban BdLBD1C-1 és Bd2g53690 – a továbbiakban BdLBD1C-2) választottuk ki az Y2H vizsgálatokhoz. A kölcsönhatás teszteléséhez klónozással létrehozott konstrukciókat az alábbi táblázat tartalmazza:

bait („csali”)		pray („préda”)	
konstrukció	klónozási hely	konstrukció	klónozási hely
pGBK-T7: BdCYC-A2	NdeI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-1	EcoRI-SalI
pGBK-T7: BdCYC-A2Δ	NdeI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-2	EcoRI-SalI
pGBT9: BdCYC-A2	BamHI-PstI	pGAD-424: BdLBD1C-1	EcoRI-SalI
pGBT9: BdCYC-A2Δ	BamHI-PstI	pGAD-424: BdLBD1C-2	EcoRI-SalI
pBD-GAL4: MsCYC-A2Δ *	EcoRI-SalI	pAD-GAL4: MtCPP1 *	EcoRI-SalI
pGBK-T7:BdLBD1C-1	EcoRI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-1	EcoRI-SalI
pGBK-T7:BdLBD1C-2	EcoRI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-2	EcoRI-SalI

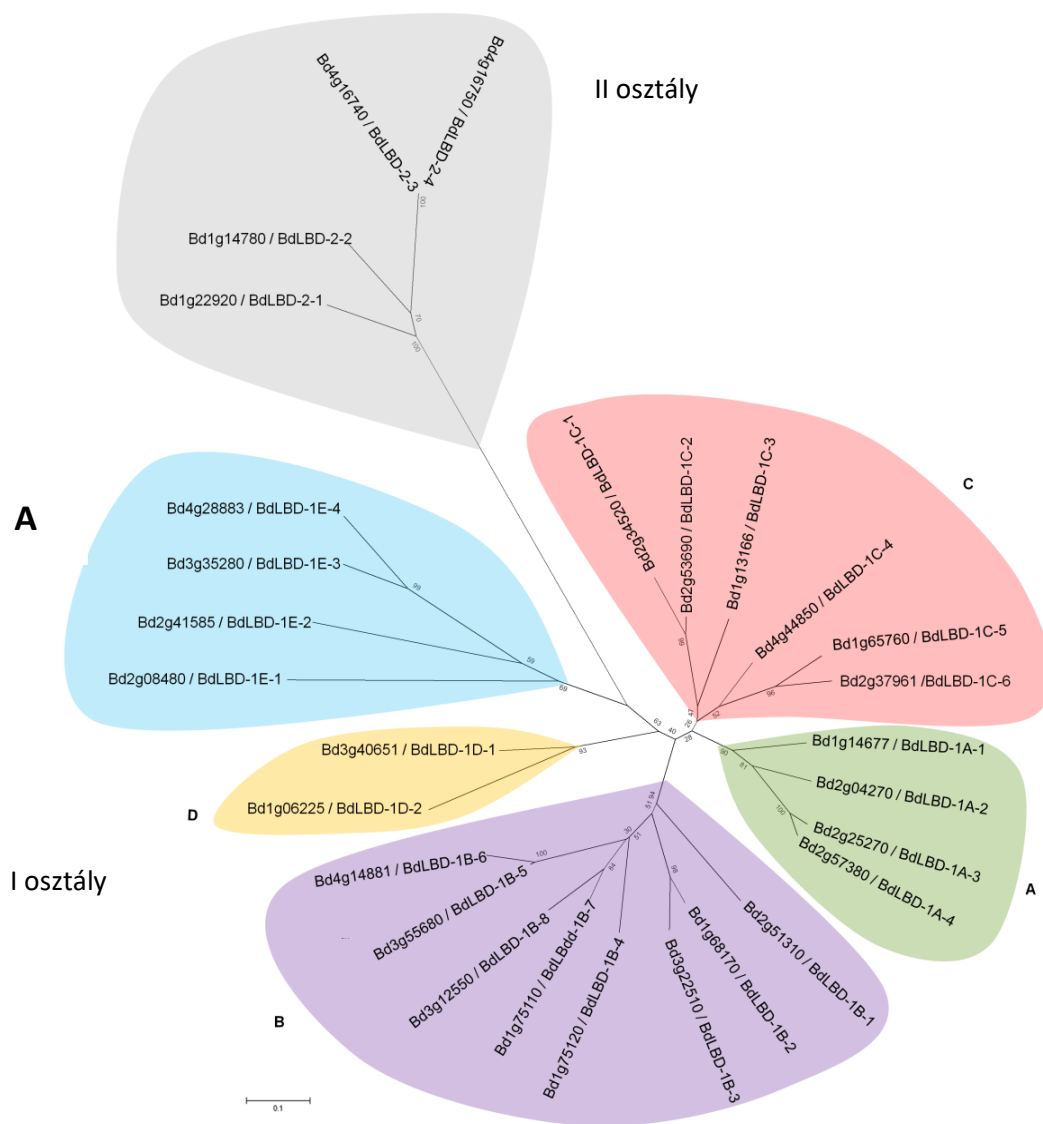
1. táblázat. Az Y2H kölcsönhatási teszthez létrehozott konstrukciók. Δ jellel tüntettük fel az un. destruktív motívum nélküli, trunkált fehérjéket hordozó konstrukciókat. * jellel tüntettük fel a teszthez használt, de nem a szerző által létrehozott konstrukciókat.

A kölcsönhatási teszthez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1 UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1) és PJ69-4A (MATa trp1-Δ901, leu2-3,112 901, ura3-52, his3-Δ 200, gal4Δ, gal8Δ, GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ) törzseit használtuk. A kompetens sejtek létrehozása és kémiai transzformációja a „Yeast Protocols Handbook” (Clontech, 2001) kézikönyvben leírtak alapján történt. A kiválasztott fehérjék kölcsönhatását kétféle módon teszteltük: a transzformáns élesztők minimál (SD), -triptofán (W), -leucin (L), -hisztidin (H), -adenin (A) mentes táptalajon (SD-WLHA) történő nevelésével valamint β-galaktozidáz aktivitás méréssel.

Az eredmények összefoglalása

A részletes szekvencia-elemzések eredményeként 28 LOB-domain transzkripciós faktort azonosítottunk be a szálkaperje genomjában. Filogenetikai vizsgálataink alapján a szálkaperje LOB-domain transzkripciós faktorai két nagyobb osztályra (II és I), az I osztályon belül további

öt alcsoportra (A-E) sorolhatók. A szálkaperje LBD génjeire általunk bevezetett nomenklatúra ezt a besorolást tükrözi: pl. BdLBD1A-1, ahol jelölve van az adott fehérje osztálya, az egyes típusba tartozó fehérjék esetében az alosztály, az adott fehérje egyedi azonosító száma pedig az alosztályon belüli divergenciára utal (a legkorábban divergált tag kapta az 1. számot, a legkésőbb divergált tag pedig a legmagasabbat). A szálkaperje LBD génjeinek filogenetikai alapú besorolása összhangban áll más fajokban végzett hasonló elemzések eredményeivel. A rizs, a kukorica, a lúdfű és a szálkaperje LOB-domain transzkripciós faktorainak összehasonlító filogeneikai analízise alapján nem találtunk csak a szálkaperjében előforduló, egyedi LBD géneket, sem az egyszikűekre jellemző leszármazási vonalat a géncsaládon belül. Különbség az egyes alcsaládok komplexitásában mutatkozott: egyszikűekben a B-alcsalád, míg kétszikűekben inkább az A-alcsalád kiterjedtebb. A géncsalád evolúciós eredetét vizsgáló kutatások alapján az LBD gének diverzifikációjában nagy szerepe volt a teljes genomot érintő duplikációs eseményeknek és az ezt követő diszpergálódásnak, valamint annak, hogy a

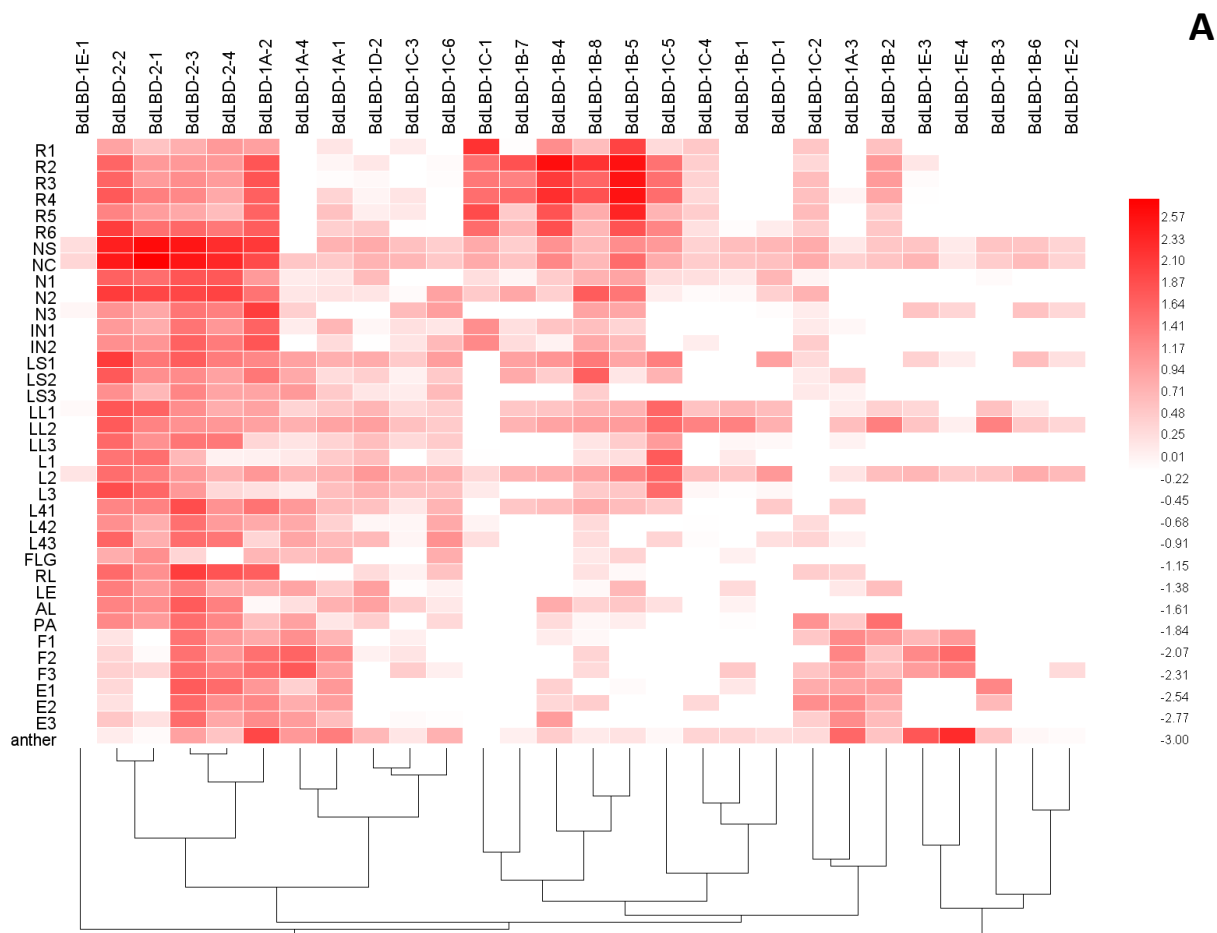


B		CX ₂ CX ₆ CX ₃ C-motif		GAS-block		coiled-coil motif	
BdLBD1D-2	13	RCAACKLRRRCARDCVLAPHF	-----ASDPQ	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1D-1	40	RCAACKLRRRCARDCVLAPHF	-----ASLPQ	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-2	26	PCACKLRRRCVSCIFAPYFD	-----SEQGAA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-3	33	PCACKLRRRCVSCIFAPYFN	-----TENGA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-7	9	PCACKLRRRCARCVFAPYFC	-----HEQGAA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-8	7	PCACKLRRRCVNCVFAFYFS	-----HEQGAA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-5	16	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFS	-----SEHGAS	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-6	9	CKLRRRCVAVCVFAFYFS	-----SEHGAS	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-4	11	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----AEDGAS	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1B-1	44	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----SGGGRR	ERGAACFAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-5	51	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PTDPA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-6	33	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PTDPA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-4	20	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PEDPA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-3	21	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----SSEPH	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-1	60	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PLEPH	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1C-2	57	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PHEPH	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1A-3	40	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PDNPQ	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1A-4	37	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PDNPQ	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1A-2	30	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PEEPQ	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1A-1	7	PCACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----PDQPA	FAVHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1E-3	72	ACAACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----ADQQR	FLNARHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1E-4	68	ACAACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----ADQQL	FLNARHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1E-2	84	ACAACKLRRRCVAVCVFAFYFC	-----AENPG	SERNHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD1E-1	20	ACVCKHORRCVAVCVFAFYFC	-----ANRMD	RAHVFVGASN	MSKLLQ	LEAEERADADA	VEASRAQDPVYGC
BdLBD 2-2	2	SONGCVLRG	GCSE	CTIR	CLEWIKSPDAQANATVF	ANFVCRAG	LNLLIAA
BdLBD 2-1	12	SONGCVLRG	GCSE	CTIR	CLEWIKSPDAQANATVF	ANFVCRAG	LNLLIAA
BdLBD 2-3	4	SONGCVLRG	GCSE	CTIR	CLEWIKSPDAQANATVF	ANFVCRAG	LNLLIAA
BdLBD 2-4	4	SONGCVLRG	GCSE	CTIR	CLEWIKSPDAQANATVF	ANFVCRAG	LNLLIAA
consensus	1	*	*	*	*	*	*

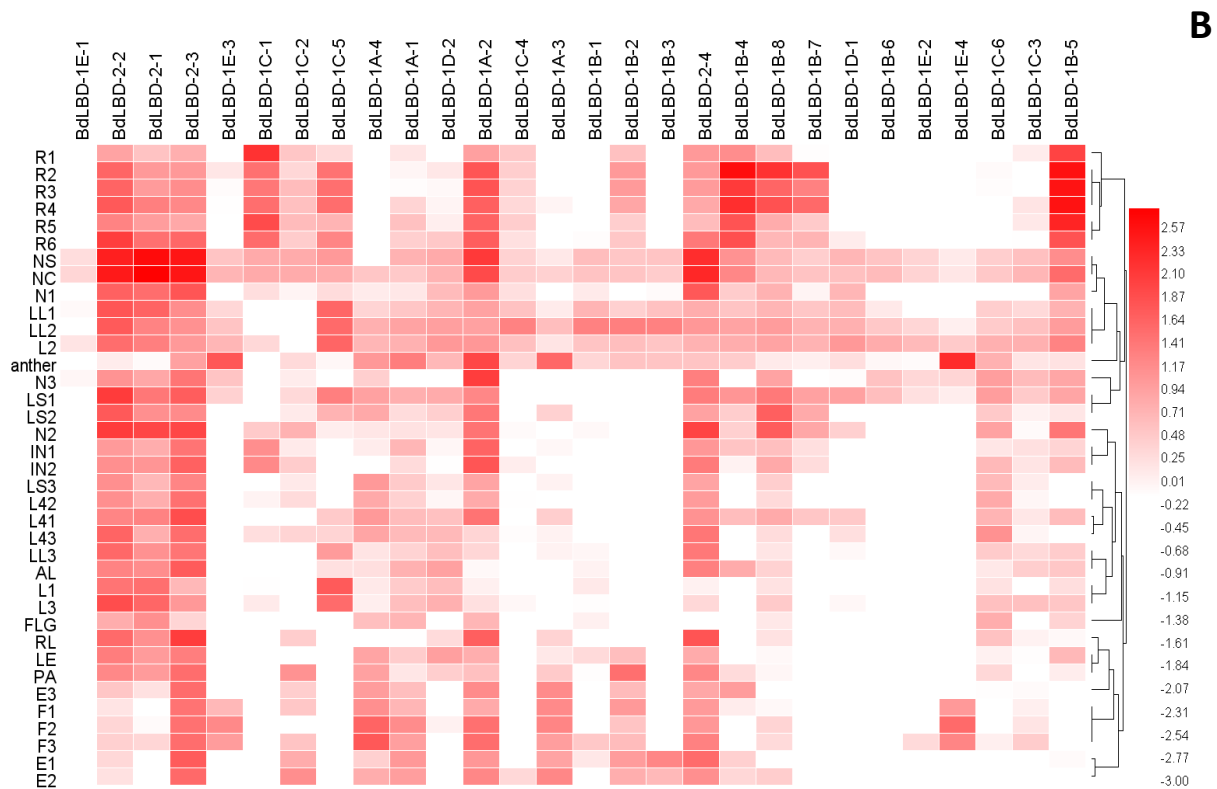
2. ábra. A) A szálkaperje LBD-domain fehérjeinek rokonsági fája. A fa a fehérjék konzervált domain-motívumának aminosav-illesztése alapján, NJ (neighbour-joining) módszerrel készült, és a MEGA6 programmal lett vizualizálva. A törzsfán az általunk adott elnevezések és a genomi azonosítók szerepelnek. A színes kiemelések a családon belüli egyes alcsoportokat jelölik. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi; az egységnyi szakasz 0,1 aminosav pozíciókénti cseréjét jelöli. Az elágazásoknál feltüntetett számok az 1000 ismétlésből származtatott bootstrap értékeket jelölik. **B)** Az LBD transzkripciós faktorok rokonsági kapcsolatainak megállapításához alapul szolgáló, konzervált domain-struktúrát kódoló aminosav-szekvenciák illesztése. * jellel a legkonzerváltabb, minden szekvenciában ugyanott elhelyezkedő aminosavak kerültek kiemelésre. Azok a konszenzus aminosavak, melyek a szekvenciák több mint 50%-ában ugyanabban a pozícióban fordulnak elő, sötét háttérrel, a szekvenciák több mint 75%-ában előfordulók fekete háttérrel kerültek megkülönböztetésére. A számok a motívumok fehérjén belüli pozícióját jelölik.

duplikációs eseményeket követően az LBD géncsalád tagjai prezerválódtak, megmaradtak az evolúció során. A kromoszomális régiók kollinearitásán alapuló *in silico* elemzésünk szerint ez alól a szálkaperje LBD géncsaládja sem kivétel. Becsléseink szerint a szálkaperje LBD géneinek mintegy 40%-a duplikációs események eredménye.

Az LBD génekre jellemző nagyfokú funkcionális divergencia kétségtávon kívül erre az evolúciós történetre vezethető vissza, és ezt tükrözi vissza az LBD génekre jellemző nagyon változatos kifejeződési mintázat is. A qRT-PCR technikával feltérképezett részletes expressziós vizsgálat alapján a szálkaperje LBD géneinek szövet/szervspecifikus kifejeződése nemcsak alcsoportonként egyedi, de gyakran csoporton belül is nagy heterogenitást mutat, és sokszor



még az egymással közel rokon LBD gének kifejeződése is jelentősen eltér egymástól. Néhány jellegzetesség ennek ellenére megállapítható: így pl. az IA alcsalád génjei leginkább a



3. ábra. A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) LBD génjeinek 37 különböző növényi részben qRT-PCR technikával meghatározott relatív transzkript mennyisége, log10 formában megadva. A relatív transzkript mennyiségek két referenciagén (UBC18- ubiquitin konjugáló enzim valamint az ELF1 α -elongációs faktor 1 alpha) átlagos kifejeződéséhez és az összes LBD gén átlagos expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva. **A)** A gének csoportosítása expressziós mintázat alapján. **B)** A vizsgált növényi részek csoportosítása a bennük expresszálandó LBD gének alapján. A minták rövidítései: R1-gyökércsúcs, R2- megnyúlási zóna, R3-differenciálódási zóna, R4- érési/felszívási zóna, R5- fiatal oldalgyökér-kezdemény, R6-érett oldalgyökér-iniciális, SN-szkutelláris gyökerek nódusza, CN- koleoptil-nodális gyökerek nódusza, N1-első levél nódusza, N2- második levél nódusza, N3- harmadik levél nódusza, IN1- első levél internódiuma, IN2- második levél internódiuma, LH1- első levél hüvelye, LH2- második levél hüvelye, LH3- harmadik levél hüvelye, LL1- első levél ligulája (levélcsukló), LL2- második levél ligulája, LL3- harmadik levél ligulája, L1- első levél lemeze, L2- második levél lemeze, L3- harmadik levél lemeze, L41- negyedik levél lemezének bazális szegmense, L42- negyedik levél lemezének középső szegmense, L43- negyedik levél lemezének apikális szegmense, ZL- zászlóslevél lemeze, KT- kalásztengely, LE- lemma (toklász), LSZ- a lemma szakállja, PA- palea (pelyvalevél), V1- kifejlett virág 1-2 nappal a pollináció előtt, V2- fejlődő virág 3-4 nappal a pollináció előtt, V3- fejletlen virág 5-6 nappal a pollináció előtt, E1- kifejlett termés 9-10 nappal a pollináció után, E2- fejlődő termés 6-7 napal a pollináció után, E3- fejletlen termés 3-4 nappal a pollináció után, portok- portok. A minták részletes leírását lásd az "anyag módszer" "mintavétel" fejezetében.

virágzatban és a levél szöveteiben expresszálandóknak, az IB alcsaládra inkább gyökérspecifikus kifejeződési mintázat jellemző, az IE alcsalád tagjai pedig inkább a portokban expresszálandóknak. Tőlük eltérően az IC, ID alosztályok tagjai igen változatos kifejeződési mintázattal rendelkeznek. Így pl. az IC alcsaládon belül van olyan gén, amely csak a vegetatív növényi részekben aktív, van olyan, amelyik a gyökérben és a generatív szervekben működik, de olyan is akad, amelyik csak a gyökér egyes szegmenseiben mutat expressziót. Az ID alcsalád esetében az LBD1D-1 csak a levél különböző részeiben, míg az LBD1D-2 szinte minden vegetatív szervben kifejeződik. Egyedül a II osztály génjeire jellemző a nem-szövetspecifikus expresszió. A szálkaperje egyes LBD génjeinek kifejeződési mintázata nagyfokú hasonlóságot mutat más fajokban (pl. lúdfüben, kukoricában, rizsben) azonosított legközelebbi rokonjaik kifejeződési mintázatával. A különböző, akár egymástól távoli rokon fajok LBD génjeinek kifejeződési mintázatai között tapasztalható egyezések alapján feltételezhetjük, hogy az egyes LBD gének funkciója evolúciósan nagymértékben konzervált lehet.

Munkacsoportunk erre a konzerváltságra alapozva kezdte el a géncsalád két tagjának, a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 funkcionális jellemzését. Korábbi élesztő két-hibrid kutatási eredményeink alapján a lucerna (*M. sativa*) A2;2 ciklinje és a *M. truncatula* egyik LOB-domain transzkripciósfaktora, az MtCPP1 kölcsönható partnerek lehetnek. Homológiájuk alapján a

BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 fehérjékről – mint az MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi rokonairól – feltételezzük, hogy az MtCPP1-hez hasonlóan közvetlen kapcsolatban állnak a sejtciklus szabályozásával. Ennek alátámasztását célozták a lucerna A2 ciklinje és az MtCPP1 közötti kölcsönhatás reprodukálására irányuló kísérleteink élesztő két-hibrid (Y2H) rendszerben, szálkaperjében megtalálható homológjaikkal. A szálkaperje A2 ciklinje és a BdLBD1C-1 valamint BdLBD1C-2 között kölcsönhatás kimutatása Y2H vizsgálatokkal zömmel negatív eredményre vezetett: ugyan többféle vektort próbáltunk ki többféle kombinációban, két különböző élesztő törzsben is, sem az auxotrófia-komplementáción alapuló növekedési szelekcióval, sem a transzformáns élesztőkből történő β -galaktozidáz aktivitás méréssel nem sikerült kölcsönhatást kimutatni a kérdéses fehérjék között. Ennek oka nem feltétlenül a kölcsönhatás teszteléséhez kiválasztott fehérjék közötti tényleges kölcsönhatás hiányában keresendő, hanem a tesztelések tanulsága alapján az Y2H rendszer korlátaival is magyarázhatók (pl. a szálkaperje A2 ciklinjének élesztő sejtek növekedésére gyakorolt negatív hatásával, melyet tapasztaltunk is kísérleteink során).

Pozitívum ugyanakkor, hogy mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 kölcsönhatásba lépett a lucerna A2;2 ciklinjével, a szálkaperje A2 ciklinje pedig az MtCPP1 fehérjével mutatott kölcsönhatást. Vagyis az Y2H tesztelések eredménye alapján potenciálisan mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 képes lehet ciklinel/ciklinekkel való interakcióra, a vizsgálatba bevont szálkaperje A2 ciklin pedig LOB-domain transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatásra, mely eredmények a LOB-domain transzkripciós faktorok és a sejtciklus szabályozásának közvetlen kapcsolatára utalnak. Ebbe az irányba mutatnak munkacsoportunk még publikálatlan eredményei is: *in vitro* foszforilációs kísérletek alapján a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 is képes foszforilálódni a szálkaperje sejtuszuspenzióból izolált ciklin-ciklin dependens kináz komplexek által. Az itt bemutatott eredményekre támaszkodva azonban még messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 és a sejtciklus szabályozása közötti direkt kapcsolatokról, és több a felmerülő kérdés, mint amennyire jelen pillanatban válaszolni tudunk. Nem tudjuk, ebben a folyamatban mely ciklin-CDK komplex vesz részt. Nem ismert ennek a szabályozási folyamatnak a szervfejlődésre gyakorolt hatása sem. Felmerül a kérdés, lehetnek-e esetleg más ciklin-CDK komplexek által szabályozott LOB-domain transzkripciós faktorok is? Az sem tisztázott, hogyan befolyásolja a ciklin-CDK komplexek által történő szabályozás a LOB-domain transzkripciós faktorok működését; és az is kérdéses, ez a feltételezhető szabályozási kapcsolat mennyire általános a növényvilágban. Ezeknek az alapvető kérdéseknek a megválaszolása további részletes kutatásokat igényel.

Tervezett kutatásaink a LOB domain transzkripciós faktorok és a ciklinek közötti kölcsönhatás funkciójának értelmezésére irányulnak. Ennek feltárása a növényi egyedfejlődés izgalmas és ismeretlen területének – a sejtosztódás és a differenciálódás összefonódásának – megismerése felé vezet.

Következtetések

A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak átfogó jellemzése érdekében végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy

- a szálkaperje 28 tagból álló LOB-domain transzkripciós faktor családjának főbb csoportjai, alcsaládjainak szerkezete, a fehérjék megoszlása az alcsoportok között más egyszikű és kétszikű fajokhoz viszonyítva alapvetően hasonló. Ennek magyarázata a család konzerváltságában keresendő.
- a szálkaperje LOB-domain transzkripciós faktorait kódoló gének kifejeződési mintázata a LOB-domain transzkripciós faktorokról eddig feltárt funkcionális sokféleségnek megfelelően nagy divergenciát mutat mind szövetspecifitás, mind az expresszió mértékét tekintve. Bár heterogén kifejeződési mintázat alapján nem lehet egy-egy alcsaládhoz egyértelmű funkciót társítani, de a kapott kifejeződési mintázatok nagyfokú hasonlóságot mutatnak más fajokban már ismert homológ LBD gének kifejeződési mintázataival, ami a gécscsalád funkcionális konzerváltságát sejteti.
- bár az expressziós mintázat ismerete az LBD gének szerepének megértéséhez messze nem elegendő, az általunk végzett génexpressziós vizsgálat jó kiindulópont a funkcionális vizsgálatokhoz.

A LOB-domain transzkripciós faktorok sejtciklus szabályozásával való kapcsolatának vizsgálatát korábbi kísérleteinkre alapozva kezdtük el. Ennek részeként teszteltük a *Medicago sativa* A2 ciklin szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológja és a *Medicago truncatula* MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjai, a szálkaperje A2 ciklin és a BdLBD1C-1 valamint 1C-2 közötti kölcsönhatást élesztő két-hibrid rendszerben. Bár a

kölcsönhatás kimutatására irányuló kísérleteink zömmel negatív eredményre vezettek, a tesztelés eredményeként megállapítható, hogy:

- potenciálisan mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 képes lehet ciklinel/ciklinekkel való interakcióra.

Az elvégzett munkánk éves bontásban:

1. év

31 különböző szárazságtűrűsű szálkaperje (*Brachypodium dystachion*) genotípus jellemzését végeztük el növekedési paramétereik illetve gyökérnövekedésük, gyöké-architektúrájuk szempontjából. Az elvégzett főkomponens analízis alapján megállapítottuk, hogy az ökotípusok között a hajtások hossza és tömege, a koleoptil-nodális gyökerek átmérője, a levélnodális gyökerek száma és teljes hossza voltak a legjobban diszkrimináló tulajdonságok. Ezeknek a jellemzőknek a kombinációi révén hat eltérő gyökérfejlődési stratégiájú csoportba tudtuk sorolni a vizsgált genotípusokat. Megállapítható, hogy a nodális gyökereknek kiemelkedő jelentősége van a különböző szálkaperje vonalak szárazsághoz való adaptációjában, ami arra utal, hogy központi szerepük van a gyökér-architektúra plaszticitásában. Az ebből már elkészült kézirat beküldés alatt van: Mária Szécsényi, Zoltán Zombori, Magdolna Gombos, Györgyi Sándor, János Györgyey: Natural variation in root architecture of *Brachypodium distachyon* accessions during moderate water-deficit stress.

Sikerült azonosítani és transzkripciós szempontból részletesen jellemezni a növényi szervfejlődésben szerepet játszó LOB-domén transzkripciós faktor géncsalád minden alcsaládját, így mind a hat, első típusba tartozó alcsalád jellemző kifejeződési helyeit megtaláltuk. Ezek közül két alcsalád mutatott jellemzően magas kifejeződést a gyökérzetben. A további jellemzésre kiválasztott alcsalád két tagját túltermelő, csendesítő és promóter-riportergén konstrukcióikat hordozó szálkaperje növényvonalakat hoztunk létre. Minden ilyen vonal felszaporítása a további vizsgálatokhoz a projekt 2. évében meg fog történni. A túltermelő vonalak előzetes jellemzése során megállapítottuk a gének ektopikus működése fejlődési illetve növekedési problémákat okoz mind a hajtásban, virágzatban, mind a gyökérzetben. A túltermelő vonalak gyökérnövekedésben mutatkozó elmaradása fokozottan jelentkezett vízhiányhoz való adaptáció során. Ezek az eredmények egyrészt arra utalnak, hogy az általunk kiválasztott LBD13 és LBD15 gének valóban jelentős szerepet játszanak a

szervfejlődés során, így mélyreható vizsgálatuk hosszú távon is indokolt, másrészt felvetik annak a szükségességét, hogy a gének túlműködtetését illetve csendesítését kontrollált működésű promóterekkel is elvégezzük. In vitro megerősítettük, hogy az LBD13-as gén kódolta transzkripció faktor képes kölcsönhatásra A-típusú ciklinekkel, ez a kölcsönhatás a megfelelő kétszikű (Medicago) ciklin fehérjével is megtörténik.

2. év

A BdLBD-1C-1 és 1C-2 géneket (korábbi munkanevükön LBD13 és LBD15) hordozó túltermelő vonalak részletes vizsgálata során megerősítettük azt a korábbi megállapításunkat, hogy ezeknek a transzkripció faktoroknak jelentős funkciójuk van az egyedfejlődés során, a túlműködtetésük erős fenotípust eredményez a vonalakban. Az LBD-1C-1 esetében egyes vonalak drasztikus törpenövést mutatnak, melyeknél a virágzás teljesen el is marad, más, virágozni képes vonalak esetében pedig elágazó, dupla hajtás fejlődését tapasztaltuk. Az LBD-1C-2 vonalakra mind a hajtás, mind a gyökérzet visszafogott fejlődése volt jellemző, ami együtt járt a keletkezett magok csökkent csíráképeségével. Az elvégzett rhizotronos vizsgálatokból kiderült, hogy az LBD-1C-2 túltermelő vonalak gyengébben fejlett gyökérzete elsősorban a később és kisebb számban megjelenő oldalgyökerek számlájára volt írható, ez különösen korlátozott vízellátás (kísérletesen előállított, mérsékelt vízhiány) esetén volt kifejezett.

Az újabb élesztő 2-hibrid vizsgálatokkal kimutattuk, hogy mindkét általunk vizsgált LBD fehérje képes dimerizációra is, és valószínűsíthető, hogy egyéb, szignálátvitelben szerepet játszó kinázok is foszforilálhatják azokat. Elvégeztük a korábbi 2-hibrid eredmények megerősítését in vitro fehérje-foszforilációs kísérletekkel. Ehhez egyrészt létrehoztunk éretlen embrió eredetű, gyorsan osztódó szálkaperje sejtszuspenziót, valamint számos különböző fúziós fehérje-kombinációt kipróbálva baktériumban való termeltetésre alkalmas génkonstrukciókat készítettünk. A megtermeltetett GST- ill. His-tag-gel ellátott LBD-fehérjéket affinitás-tisztítást követően a sejtszuspenzióból – kromatográfiás ágyhoz kötött CKS fehérje felhasználásával – tisztított CDK/ciklin komplex foszforilációnak vetettük alá ³²P-jelölt ATP felhasználásával. Az elvégzett kináz reakció mindkét fehérje esetében igazolta, hogy a sejtciklus központi regulátor-komplexe képes ezek foszforilációjára.

Szálkaperje két vonalának (BD21 és Bd21-2) gyökerén, a gyökércsúcs eltávolítása után egy héten keresztül nyomon követtük a miRNS expressziós változásokat. A vizsgálatunkhoz 30 szálkaperjében aktív miRNS választottunk, melyeknek előzetes irodalmi adatok alapján

kapcsolódhatnak az oldalgyökér képződéshez. A vizsgált 30 miRNS közül 6 nem volt aktív egy vonalban sem a vizsgált gyökérrégióban (164a,b,e,f; 172a; 393a,b;169d; 398b; 399a). Az aktív, detektálható miRNSek közül változatlan szintű expressziót mutatott a kísérlet minden mintavételi napján, mindkét vonalban két miRNS (164c és 396c,d). A fennmaradó 26 kis RNS transzkript szintje jórészt emelkedő értékeket vett fel. A hat legmagasabb expressziós változást mutató miRNS (166a,b,c,d; 156a,b,c; 160 a,b,c,d; 319a; 390a; 396e) Bd21-es vonalban a gyökércsúcs eltávolítása után négy nappal (Bd21-3-as vonalban három nappal) az miRNA mennyisége egy maximumot mutat, majd lecsökken.

3. év

Osztályoztuk, egységes nevezéktant adtunk a szálkaperje LOB-domén transzkripció faktor géncsalád minden tagjának, befejeztük alapvető szerv-, ill növényi rész-specifikus transzkript szint jellemzésüket. Ebből egy minden további munkánkat megalapozó Q1-es újságban megjelent közlemény született (Gombos és mtsai, Plant Cell Reports, online 2016, print 2017).

Újgenerációs szekvenálási módszerrel végeztetett transzkriptóma szekvenáláshoz a szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) Bd21-es vonal magjaiból elvégeztük a növények felnevelését nevelőkamrában, 22 °C-on, hosszúnappalos körülmények között (18 óra fény / 6 óra sötét), normális vízellátás (cca. 80%-os víztelítettség) mellett, Hoagland tápoldatos öntözéssel, gyökéreredetű RNS tisztítására alkalmas perlit-homok nevelőközegben. Mintegy 200 növényről gyűjtöttünk 3 hetes korukban 50-100 mg-nyi gyökércsúcs, oldalgyökér-iniciális, valamint a nodális gyökerek eredési helyeként szolgáló első levélnódusz mintákat, majd a lefagyasztott mintákból össz-RNS-t tisztítottunk módosított CTAB-LiCl extrakciós módszerrel. Ennek eredményeként gyökércsúcsból 120 µg, oldalgyökér-iniciálisból 16 µg, első levélnóduszból 104 µg totál-RNS-t nyertünk ki.

Ezekből végeztettük el a transzkriptóma-szekvenálást módszerrel az Illumina HiSeq platformján, melyhez a könyvtárakat az Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit v2-es verziójával készítette el a Seqomix Kft. A kapott nyers szekvencia-adatok elemzése során megvizsgálták a szálkaperjében található LOB-domén (Lateral Organ Boundary domain) transzkripció faktor fehérjét kódoló teljes, 28 tagú géncsalád minden tagjának előfordulását, valamint az általunk kiválasztott két-két ciklin-A és cdk fehérjéket kódoló gének transzkript-gyakoriságát. A transzkriptóma-szekvenálási eredmények alapján összefoglalóan

megállapítható, hogy magas szinten fejeződnek a ki mindhárom mintában a kettes osztályba tartozó BdLBD-2-1, 2-2, 2-3 és 2-4 gének, továbbá az 1A alosztályba tartozó BdLBD-1A-2 gén is. A gyökércsúcs mintában kiugróan magas szintet mértünk a BdLBD-1C-1 és a BdLBD-1B-5 gének mRNS-eiből, továbbá kevésbé kiugró, de még magas transzkriptszinteket találtunk ugyanitt a BdLBD-1B-2, 1B-4, 1B-8, 1C-2 és 1C-4 gének esetében, míg az 1D és az 1E alcsaládok minden tagja kifejezetten alacsony gyakorisággal fordult elő. Az oldalgöyker-iniciális gyökérrégióban a fent említett géneken túl magas/közepesen magas transzkript-szinten megjelennek még az 1A-1, 1B-7 és 1C-5 gének is. Az első levélnódusra jellemző, hogy a gyökércsúcsban és oldalgöyker-képződés helyén kifejeződő fent felsorolt gének mRNS-ei nagyságrenddel ritkábban ugyan, de jól detektálhatóan előfordulnak, és mellettük hangsúlyosan megjelennek az 1D alosztályba tartozó BdLBD-1D-1 és 1D-2 gének transzkriptumai is. A vizsgált ciklin és cdk gének mRNS-ei mindegyik mintában jelentős szinten detektálhatók voltak, összhangban azzal, hogy mindhárom mintában nagy számban fordulnak elő aktívan osztódó sejtek. A transzkriptómaszekvenálás eredményei összességében megerősítették a korábban, sokkal több mintán elvégzett, de lényegesen kisebb pontosságú és részletességű qPCR-es transzkript-szint vizsgálatok eredményeit is.

A mikro-RNS kísérleteink során célunk volt az oldalgöyker fejlődésben szerepet játszó miRNS-ek azonosítása szálkaperjében, illetve az azonosított nagyobb jelentőségű miRNS-ek mennyiségének vizsgálata gyökérfejlődés befolyásolása után (ozmotikus stressz). Vizsgálatainknak a szálkaperje két ökotípusát vetettük alá (Bd21, Bd21-3), melyeket MS ferde táptalajon növesztettünk. A mellégöyker-növekedést a gyökércsúcs eltávolításával indukáltuk és ezt követő negyedik és ötödik napon közel azonos időpontban mintát vettünk. Vizsgáltuk az miRNS mennyiségi változásokat az idő függvényében, kontroll és polietilén glikollal indukált osmotikus stressz esetén.

Az általunk előző évben kiválasztott 30 szálkaperjében aktív miRNSből 6 darab transzkript szintje kiemelkedően magas volt mindkét általunk vizsgált vonal esetén, így az osmotikus stressz kísérletben ezeknek a szekvenciáknak a mennyiségi változását vizsgáltuk. A hiperozmotikus közeg számos változást okozott az miRNS-ek relatív mennyiségében. A két mintavételi napot a két vonalban a vizsgált miRNS mennyiségi változásait összevetve miR167 a,b; miR396 a,b; miR159 a jelentőségét lehet kiemelni az osmotikus stressz elleni védekezésben. Az itt kapott eredmények nagyfokú hasonlóságot mutatnak Akdogan 2015-ben búzán mért eredményeivel, melyek szintén PEG kezelés hatását írták le.

4. év

Folytattuk a korábbi in vitro fehérje-foszforilációs kísérleteket, melyekkel megerősítettük a korábbi, élesztő két-hibrid vizsgálatok alapján felállított munkahipotézist. Ehhez létrehoztunk az alapvető Bd21-es szálkaperje genotípusból egy jól osztódó, gyors szaporodású sejtszuspenziót, melyből affinitás-kromatográfiával CDK/ciklin fehérjekomplexet tisztítottunk. Ehhez adott, E.coli-ban termeltetett hogy a sejtciklus-szabályozó CDK/Ciklin fehérjekomplex képes foszforilálni legalább két LOB-domén fehérjét, az LBD1-C1-et és LBD1-C2 -t szálkaperjéből. Továbbá kimutattuk, hogy képesek DNS kötésre, és előállítottunk poliklonális egér ellenanyagokat ellenük a további vizsgálatokhoz. Az ellenanyagok bár felismerték az immunizáláshoz használt baktériumban termeltetett fehérjét, sajnos jelentős aspecifikus háttérrel mutattak. Ennek csökkentésére az antigénnel affinitás-tisztítást végeztünk, azonban ezzel sem sikerült a háttérrel elfogadható szintre csökkenteni.

Alternatív módszerként megpróbálkoztunk olyan módosított oligonukleotidok (ON) használatával, melyekkel a génmódosítással létrehozott illetve mutáns vonalakhoz képest egyszerűbben, gyorsan és hatékonyan lehet csendesíteni a kiválasztott LOB- domén és sejt ciklus géneket szálkaperjében. Ahhoz, hogy ON-okkal átmenetileg csendesíthessük a gyökerek célgénjeit, első feladatunk olyan kezelési módszer kidolgozása volt, amely biztosítjával az ON-kat a vizsgálandó szerv általi vel hatékonyan felvetetésétjük. Az volt az elképzelésünk, hogy a korábbi sikeres módszerünket szálkaperjére adaptálva, a levelek sebzésén keresztül felvett ON-ok eljutnak a gyökerekig, ott csendesítenek a LOB- domén géneket, aminek következtében csökken az mRNS szint és ideális esetben fenotípusos változást is megfigyelhetünk. Azonban azt tapasztaltuk, hogy az ON-ok nem jutottak el a gyökerekig sem a levél, sem a koronagyökereket adó náduszok feletti szár megsebzésével, sem pedig az internódiumba történő injektálással. Ezt követően olyan növénynevelési módszert kerestünk, amellyel a gyökerek többnapos kezelése a lehető legkisebb térfogatú ON oldattal kivitelezhető. Ezért a felvetéssellevágott gyökércsúcsokon át próbálkoztunk, először földbe ültetett, később szilárd, legvégül pedig folyékony tápoldatban nevelt növények levágott gyökércsúcsain át próbálkoztunk, ugyanis olyan növénynevelési módszert kerestünk, amelyben a gyökerek többnapos kezelése a lehető legkisebb térfogatú ON oldattal kivitelezhető. A kipróbált módszerek közül a hidropóniás eljárás bizonyult a legjobbnak, amely során az ON-okat kis térfogatú tápoldatba adagoltuk. Ez azonban még így is nagy anyagigényű volt és emiatt nem volt alkalmas a tervezett nagyszámú ON-ok gécscsökkentési hatékonyságának tesztelésére,

ezért ezt a feladatot az időközben előállított szálkaperje sejtuszpenzió folytattuk. Mivel a szuszpenzió sejtjei infiltráció, vágási sérülések és ozmotikumok alkalmazásával sem vették fel jónagy hatékonysággal az ON-kat, ezért szükségessé vált a sejt fal leemésztése. Két úton kívántunk sikerült előállítani protoplasztokat előállítunk, egyrészt szálkaperje levelekből, másrészt sejtuszpenzióból. Az utóbbi esetben különböző enzim-elegyeket próbáltunk ki alapul véve az árpa és búza növényerőlkén ismert publikált eredményeket. A kidolgozott protoplasztálási módszernek köszönhetően a jövőben könnyebben tudjuk értékelni az oligonukleotidok hatását mind géncsendesítésben mind pedig a génszerkesztésben.

A metodika elmúlt években bekövetkezett gyökeres átalakulása miatt szükségessé vált a génszerkesztés rendszerének megalapozása is szálkaperjében. A korábban sikeres adaptált és optimalizált agrobaktérium-mediált transzformációval elvégeztük a CRISPR módszerhez szükséges CAS9-es fehérje egyszikűben való expressziójára alkalmas génkonstrukció bevitelét szálkaperje regeneráló kallusz-tenyésztésébe. Az így létrehozott vonalak tesztelése jelenleg folyik, célunk, hogy legalább két független, stabil expressziós szintet mutató vonalat létrehozzunk, melyeknél egykópiás integráció történt, és az integráció helye nem ugyanaz a kromoszóma. Ezeknek, mint recipiens vonalaknak a használatával elvégezhető bármely LBD gén szerkesztése a jövőben a megfelelő, tranziens módon bejuttatott guide-RNS használatával úgy, hogy a célgéntől eltérő kromoszómán található CAS9-es transzformáns vonalat használunk recipiensnek, lehetővé téve transzgénmentes utódvonalak gyors szegregációját.

Az LBD-1C-1 és 1C-2 gének sejtciklusgénekkkel való kölcsönhatásának részletes vizsgálatához sejtuszpenziós vonal szinkronizálási rendszerét adaptáltuk szálkaperjére. A sejtek S-fázisban való blokkolásához hidroxü-ureát használtunk. Rövid koncentrációsoron (5-20 mikrom között) vizsgáltuk a blokkolás hatékonyságát. A tisztított sejtmagokon végzett flow-cytometriás mérések azt mutatták, hogy 10 mikrom elegendő az osztódás megállításához. A blokkolószer kimosását követően azonban a sejtek elhúzódóan folytatták a sejtciklusukat. Ennek valószínű magyarázata, hogy a sejtuszpenzióban több, különböző morfológiájú sejt is található. A sejttenyészet további finomítása és homogenitásának jelentős javítása szükséges ahhoz, hogy a jelenleginél 2-3-szor jobb szinkronitást érhesünk el, ami a további munka előfeltétele.

A használt sejttenyészetben vizsgáltuk mind a részletes munkára kiválasztott két LBD, mind a géncsalád többi tagjának mRNS szintjét. Arra a meglepő eredményre jutottunk, hogy néhány, zömmel LBD-2-es alcsaládba tartozó gén expressziós szintje megnövekszik a táptalajcserét megelőző napokban, azonban ez az eredmény nem reprodukálható, ha rendszeresen mintát

veszünk a lombikokból. A kérdést körbejárva arra jutottunk, hogy ezeknek a géneknek az indukcióját a tenyésztés során előálló hipoxia, ill. lecsökkent oxigénszint okozhatja. Ez is magyarázata lehet annak, hogy a heti egyszeri rendszeres táptalajcsere esetén dinamikusan növekedő tenyészet osztódási jellemzői megváltoznak abban az esetben, ha a szinkronizációhoz szükséges kezelések miatt naponta többször friss levegő éri a lombikban tenyésztett sejteket. A szinkronizált rendszerünk kialakítását ennek figyelembevételével igyekszünk optimalizálni.

A pályázat keretében készült el a „Genome-wide identification of glutathione transferase superfamily in model organism *Brachypodium distachyon*” című Functional Plant Biology folyóiratba elfogadott cikk, melyben a szálkaperjében található GST fehérjék génjeiről adtunk átfogó jellemzést.

A káros anyagcseretermékek méregtelenítése meghatározó a növényi stressz-válasz hatékonyságában. A glutation redukált formájával ezeknek a mérgező stressz-melléktermékeknek egy részét a glutation transzferáz (GST) enzim szupercsalád tagjai bontják el. Ezeknek az enzimeknek a családját vizsgáltuk a modell-organizmus: *Brachypodium distachyon* Bd21 és származéka, egy szárazságtűrő Bd21-3 vonal esetében. Az ozmotikus stressz-kezelés mindkét *Brachypodium* genotípus vízpotenciáljának csökkenését eredményezte, a kontroll és a kezelt növény Ψ_w közötti különbsége a Bd21-3 utolsó mintavételi napjával csökkent, ami bizonyos mértékű alkalmazkodásra utal az alkalmazott ozmotikus stresszel szemben. A fokozott GST-aktivitás erőteljes védelmi reakciót mutatott a redox-környezet egyensúlyának hiánya miatt.

A genomszekvencia átvizsgálása 91 teljes hosszúságú vagy részleges GST szekvencia azonosításához vezetett. Bár a szálkaperjének viszonylag kis genomja van, az azonosított GST-gének száma szinte ugyanakkora volt, mint amennyit a búzában korábban tapasztaltunk. A GST-expressziók mérése azt mutatta, hogy a stressz az alábbi különbségeket okozta: magasabb expressziós szintek vagy gyors indukció BdGSTF8, BdGSTU35 és BdGSTU42 géntermékek esetében, ez feltételezhetően az intenzív méregtelenítéshez szükséges az ozmotikus stressz alatt.

Ahhoz hogy a jövőben jobb stressztűrő növényeket hozhassunk létre, meg kell érteni a növényt védő mechanizmusokat, és azonosítani kell ezeknek a folyamatoknak az elemeit, köztük a stressz-válaszokban részt vevő géneket és azok filogenetikai variabilitását. Ilyen jelöltek azok a glutation transzferázok (BdGSTF8, BdGSTU35 és BdGSTU42), melyek emelkedett vagy

indukálható génexpressziós szinteket mutatnak a szálkaperjében az ozmotikus stressz során. A *Brachydpodium* vonalakban a tau és phi osztályokhoz tartozó GST-kódoló szekvenciák ezeknek a fajtáknak a talajszárazsággal szembeni magas toleranciáját eredményezhetik a stressz során keletkező toxikus anyagcseretermékek hatékony méregtelenítésével.