

Zárójelentés

A pillangós modellnövény *Medicago trunculata* nitrogénkötő és mikorrhiza szimbiózisának vizsgálata

OTKA D48451 2004-2009

I. A LIN gén szerepének vizsgálata *Medicago truncatula*ban

Az EMS mutagenézis eredményeként izolált *lin* mutáns *Medicago truncatula* A17 növény gyökerén vad típusú szimbióta baktérium jelenlétében nem alakul ki szimbiózis, csak a kezdeti növényi válaszreakciók indukálódnak: a belső kéregsejtek osztódása következtében a gümőprimordium kialakul, de nem képes tovább fejlődni; eközben a gyökérszőrökben az infekciós fonál kifejlődik, melyekbe a baktériumok bejutnak, azonban a folyamat leáll az epidermiszben, a gyökér belső rétegeibe már nem tudnak bekerülni. A *lin* mutáns így nitrogénkötésre képtelen, ún. Fix⁻ növény, és fenotípusa alapján feltételezhető, hogy a mutációért felelős génnek fontos szerepe van a baktérium invázióban és a gyökérgümő fejlődésében.

Térképezésen alapuló klónozás segítségével sikerült azonosítanunk a *lin* mutációt hordozó gént, ezután célunk a már azonosított gén, illetve az általa kódolt fehérje további vizsgálata volt.

Ezen vizsgálatokat számos, különböző klón előállításával kellett kezdenünk, mely munka megkönnyítése érdekében a Gateway klónozási rendszert (Invitrogen) használtuk. Első lépésként a teljes *LIN* cDNS-t amplifikáltuk, a kész PCR terméket pCR8GW-TOPO entry vektorba klónoztuk, majd szekvenálással bizonyosodtunk meg a DNS hibátlan beépüléséről és szekvenciájáról. A későbbiekben ebből a vektorból rekombináztattuk át a cDNS-t a különböző kísérletekhez adekvát fehérje-expressziós, növényi transzformációs, vagy élesztő két-hibrid rendszerhez alkalmas célvektorokba.

POZITÍV FUNKCIONÁLIS KOMPLEMENTÁCIÓ

Végző bizonyítékként arra nézve, hogy a *lin* fenotípust az általunk azonosított génben bekövetkezett mutáció okozza, funkcionális komplementációt végeztünk. Ehhez

először egy növényi transzformációra alkalmas vektorba, a pK7WG2D vektorba építettük át a teljes *LIN* cDNS-t, mely konstrukcióban egy CaMV-35S promóter biztosítja a gén általános kifejeződését. A használt vektor egy GFP fehérjét kódoló gént is hordoz, mely megengedi a transzformált és nem transzformált növényi részek megkülönböztetését fluoreszcens mikroszkóppal. Mivel gyökéren megfigyelhető fenotípust vizsgáltunk, az *Agrobacterium rhizogenes* által közvetített ún. „hairy-root” transzformációs rendszert használtuk. A *lin* mutáns *M. truncatula* növényen a pK7WG2D::LINcDNS konstrukciót hordozó *A. rhizogenes* baktériumokkal transzformáns gyökereket indukáltunk, majd ezeket inokuláltuk a szimbiota partner *Shinorhizobium meliloti* 1021-hemA::lacZ baktériummal, így nem csak a növényi változásokat, hanem a baktérium jelenlétét is ellenőrizni tudtuk β -galaktozidáz aktivitásra történő festéssel. A kísérletet háromszor ismételtük meg, és kísérletenként 40 növényt vizsgáltunk meg. Baktériumokat tartalmazó, vad típusú gümöket figyelhettünk meg a GFP pozitív, azaz a vad típusú LIN cDNS-t hordozó gyökereken, míg csak kezdődő primordiumokat láttunk a GFP-re negatív, azaz nem transzformált gyökereken. Így bebizonyosodott, hogy valóban az általunk izolált génben bekövetkezett mutáció okozta a *lin* mutáns fenotípust, hiszen a CaMV-35S promóter által kifejeztetett génről átíródó fehérje komplementálta a mutáns fenotípust.

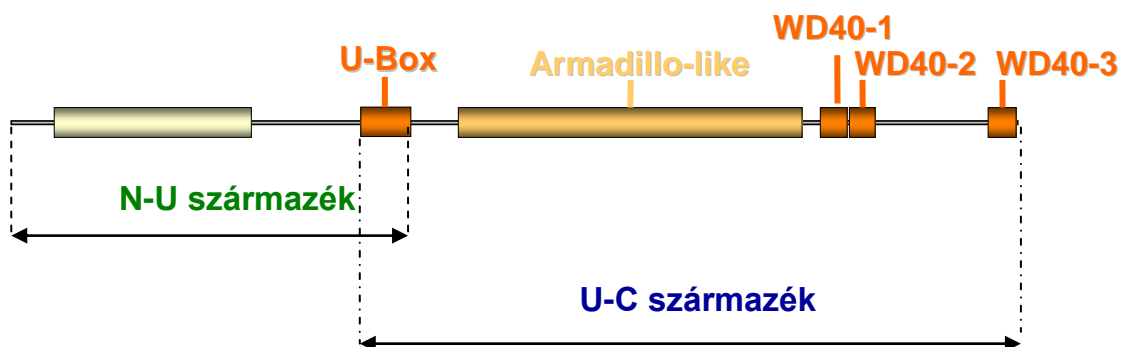
PROMÓTER AKTIVITÁS VIZSGÁLAT

A *LIN* gén kifejeződésének vizsgálatához a kódoló régiótól 5' irányban található 1,2 kb DNS szakaszt klónoztuk és GUS riporter génhez fuzionáltattuk, majd ezt a pLIN-GUS konstrukciót *A. rhizogenes* transzformációval juttattuk be vad típusú *M. truncatula* növényekbe. Ezután követtük a GUS aktivitást a fertőzetlen, valamint *S. meliloti* 1021 baktériummal fertőzött transzformáns gyökerekben. A fertőzetlen gyökereken nem volt GUS aktivitás, illetve egy nagyon gyenge jel volt látható a gyökerek apikális részén. A fertőzött gyökereken három nappal a baktériumfertőzés után erős GUS aktivitás volt megfigyelhető az osztódó kortikális sejtekben, melyekből később a gümőprimordium fejlődik ki. Hat nappal a fertőzés után a kifejlődött fiatal gümők is erős aktivitást mutattak. Érett, 21 napos gümőkben a promóter aktivitása elsősorban az infekciós zónára korlátozódott, jóval kisebb, gyenge aktivitás volt csak jellemző a gümő nitrogénkötő zónájára.

FEHÉRJE FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

A DNS szekvenciából következő aminosav szekvencia analízise alapján a fehérje legjobb homológiát mutató doménje egy ún. U-box domén, melyet egy gyengébb hasonlósági fokú Armadillo-repeat motívum követ, a C terminálison pedig három, fehérje-fehérje kölcsönhatásokban résztvevő WD40 domén van. Az N terminálison található kb. 400 aminosavból álló szakasz egy eddig azonosítatlan, egyedi domént hordoz (1. ábra).

1. ábra A *Medicago* LIN fehérje doménszerkezete és az ubiquitinációs tesztben használt származékok bemutatása.



Az U-box domén az ubiquitináció folyamatában kulcsfontosságú E3 ubiquitin-ligáz aktivitású enzimekben található meg, tehát a LIN fehérje homológia alapján feltételezhető funkciója különböző folyamatoknak a fehérjék degradációján keresztüli szabályozása lehet. A már megszekvenált genomok elemzése alapján ismert, hogy a növényekben számos U-box domént hordozó potenciális E3 ubiquitin-ligáz kódoló gén van. A LIN fehérje doménszerkezete egyedinek mondható, és mutáns fenotípusa alapján feltételezhetően egy, a szimbiózisra specializálódott funkcióval bíró ubiquitin ligáz - bár homológjai néhány nem-pillangós növényben megtalálhatók (nyár-*Populus trichocarpa*, szőlő-*Vitis vinifera*, rizs-*Oriza sativa*).

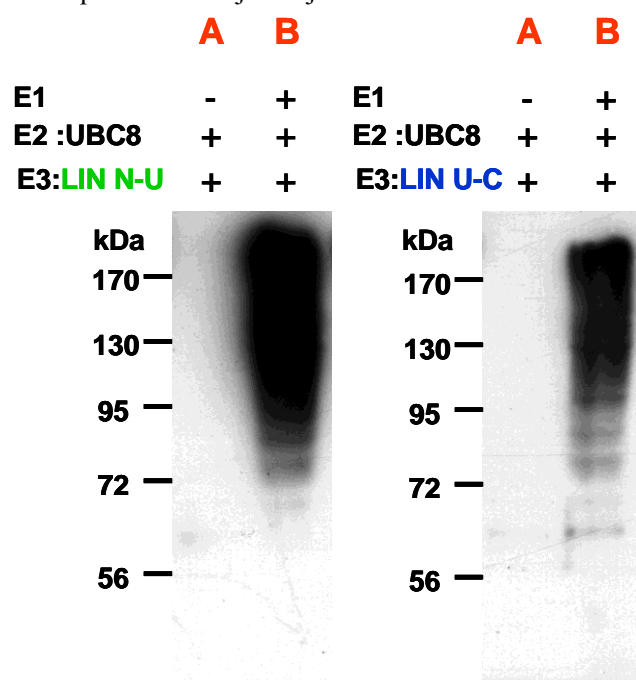
A LIN fehérje feltételezett E3 ubiquitin ligáz funkciójának egyik lehetséges bizonyítéka az ún. *in vitro* ubiquitinációs teszt. Ebben a tesztben, amennyiben ubiquitin molekulák, E1 ubiquitin-aktiváló enzim, és megfelelő E2 ubiquitin-konjugáló enzim mellett funkcionáló E3 ubiquitin-ligáz enzimet is adunk az optimalizált reakcióelegyhez, ott végbemegy az ubiquitinációs reakció az E3 ubiquitin-ligáz természetes szubsztrátja hiányában is, a reakcióelegyhez adott *E. coli* fehérjéken. Mivel

az *E. coli* maga nem rendelkezik ubiquitinációs apparátussal, ebben a kísérleti rendszerben biztosítva van, hogy a fehérjék kimutatható ubiquitinációja az általunk a rendszerhez adott enzimek által valósul meg. Az ubiquitinációs reakció detektálását a reakcióelegy SDS-PAGE futtatása, majd blotolása utáni, ubiquitin ellenanyaggal elvégzett Western-blot kísérletben ellenőriztük (2. ábra). A teszthez *Saccharomyces cerevisiae* tisztított E1 ubiquitin-aktiváló enzimet (Sigma), valamint az *Arabidopsis thaliana* UBC7 ill. UBC8 E2 ubiquitin-konjugáló enzimeit használtunk (az UBC7, UBC8 expressziós klónokat Daphne Goring –University of Toronto- bocsátotta rendelkezésünkre). Az utóbbi két enzimet, valamint a LIN fehérjét expresszáltattuk *E. coli*-ban, majd a termelő baktérium lizátumát használtuk a reakcióhoz, biztosítva ezzel az ubiquitinációhoz nemcsak a reakciót végző enzimeket, hanem a szükséges szubsztrát fehérjét is. Mivel a teljes hosszúságú LIN fehérjét (166 kDa) számos expressziós rendszert és növesztési-indukálási körülményt kipróbálva sem sikerült *E. coli*-ban kifejezteni, a reakcióhoz két „vágott” származékát használtuk (1. ábra). Az egyik származék a fehérje N-terminális végétől az U-box domén végéig (N-U; 74 kDa), a másik származék az U-box domén elejétől a fehérje C-terminális végéig tart (U-C; 109 kDa), tehát az E2/ubiquitin komplex kötéséért felelős U-box domén mindkettőben jelen volt.

2. ábra. *In vitro* ubiquitinációs teszt Western-blot analízise.

A: E1 ubiquitin-aktiváló enzimet nem tartalmazó, negatív kontroll reakcióelegyek

B: az ubiquitinációhoz szükséges mindhárom enzimet tartalmazó reakcióelegyek, melyekben a jelet a ubiquitinált fehérjék adják



Kísérleteinkben az E2 enzimként az UBC8-at használva, mindkét LIN származékkal sikerült kimutatnunk ubiquitinációs aktivitást (2. ábra), így sikerült igazolnunk, hogy a LIN fehérje egy funkcióképes E3 ubiquitin-ligáz. Azt tapasztaltuk, hogy az U-C fehérje szakasz valamivel kevésbé volt aktív, mint az N-U fehérjeszegmens. A jövőben hasonló kísérletekben szeretnénk kimutatni, hogy a LIN fehérje mely része szükséges és elégséges funkciója betöltéséhez, valamint ebben a rendszerben szeretnénk tesztelni az időközben feltételezett LIN partnerként azonosított fehérjék esetleges szubsztrát szerepét. Ez a rendszer arra is alkalmas, hogy azonosítsuk azokat a *M. truncatula* E2 ubiquitin-konjugáló enzimeket, amelyek a LIN esetleges enzim párjai lehetnek az ubiquitináció során.

FEHÉRJE LOKALIZÁCIÓ MEGÁLLAPÍTÁSA

A LIN fehérje növényi sejten belüli elhelyezkedésének kimutatására GFP-t fúzionáltattunk a fehérje C- (pMDC201 vektorban), ill. N terminális (pMDC43 vektorban) végére is. A GFP::LIN fúziós konstrukcióval transzformált „hairy-root” gyökerekben fertőzetlen állapotban, ill. a *S. meliloti* történő fertőzés után követtük a fluoreszcens jelet konfokális mikroszkóp segítségével. Negatív kontrollként, a háttér fluoreszcencia meghatározásához a csak GFP-t hordozó plazmiddal transzformált gyökereket használtuk, ahol a várakozásnak megfelelően a GFP jel a sejtek citoplazmájában és a sejtmagban egyenletesen oszlott meg. A GFP::LIN fúziós fehérje viszont a sejtmag membránjában, illetve az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódott. Ennek megerősítésére kontrollként már ismertén az endoplazmatikus retikulumban (pMON999 35S: ER-CFP) illetve a sejtmagban lokalizálódó (pMON999 35S: CFP-NLS) fehérje-expressziós konstrukciókkal is előállítottunk transzformáns *Medicago* gyökereket, melyek lokalizációs mintázata megegyezett a LIN fehérjével. A kontroll konstrukciókat prof. Theodorus W. J. Gadella (University of Amsterdam) bocsátotta rendelkezésünkre. A LIN fehérje lokalizációja jól egybevágh feltételezett funkciójával, hiszen az ubiquitinált fehérjék lebontása a 26S proteozómában történik, mely elsősorban az endoplazmatikus retikulum felszínéhez, a plazmamembránhoz és egyéb citoskeletális elemekhez kötődik nagy mennyiségben.

ÉLESZTŐ KÉT-HIBRID KÍSÉRLETEK

A LIN fehérje valószínűsíthető funkciója homológiája, valamint az *in vitro* ubiquitinációs tesztben kapott eredményeink alapján különböző folyamatoknak a fehérjék degradációján keresztüli szabályozása lehet, ami feltételezi, hogy több más fehérjével is kapcsolatot létesít. Partnerei egyrészt eddig még azonosítatlan E2 ubiquitin-konjugáló enzimek, valamint olyan fehérjék, melyek lebontásában vesz részt, és amelyek így szubsztrátjai az ubiquitinációs reakciónak. A lehetséges interaktorokat élesztő két-hibrid rendszer segítségével kerestük. Ehhez a pBD-GAL4 és pAD-GAL4 (Stratagene) vektorokat úgy módosítottuk, hogy kompatibilisek legyenek a Gateway klónozó rendszerrel, majd az így létrehozott pBD-Gal4-GW(C1) és pAD-Gal4GW(C1) vektorokba építettük be a teljes LIN cDNS-t. A lehetséges kölcsönható fehérjék megtalálásához *S. meliloti 1021* baktérium törzsszel történt fertőzés után leszedett, 2-4 napos fiatal *M. truncatula A17* gyökérgümő kezdeményeket és gyökérdarabokat tartalmazó növényi mintából készített, a Stratagene pAD-Gal4 vektorába klónozott cDNS könyvtárat használtunk, melyet Dr. Györgyei János (MTA SZBK Növénybiológiai Int.) bocsátott rendelkezésünkre. A transzformációs kísérletek beállítása után elvégeztük a cDNS könyvtár tesztelését PJ69-4A élesztő törzsben, a jelölteket SD-ALT táptalajon szelektálva. A teljes cDNS könyvtárat leteszteltük, melynek eredményeként csak 30 lehetséges interaktor jelöltet kaptunk. A további vizsgálatok (mindkét irányban elvégzett pár-teszt) során eddig egyikkel sem kaptunk pozitív reakciót, azonban ennek még lehetnek technikai okai. Western kísérletekkel ellenőriztük a teljes LIN fehérje kifejeződését élesztőben, és az alacsonynak bizonyult, ill. egyedi kolóniából indulva akár kimutathatatlan is volt. Ezért ismételt tesztekkel végeztünk, mellyel több úton próbáltuk az esetleges jelöltek számának növelését elérni. Enyhített szelekció mellett, SD-HLT lemezekken, különböző koncentrációjú AT (3-amino-1,2,4-triazol) hozzáadása mellett ismételtük meg a tesztelést, valamint előállítottunk olyan „bait” konstrukciókat, amelyekben a teljes fehérje helyett deléciós származékait használtuk a cDNS-könyvtár tesztelésére. E konstrukciók használatával eddig három pozitív jelöltet találtunk, melyeket fehérje expressziós vektorokba klónoztuk. A termeltetett fehérjéket *in vitro* ubiquitinációs tesztben fogjuk megvizsgálni annak eldöntésére, hogy lehetnek-e a LIN fehérje természetes szubsztrátjai. E kísérletek folyamatban vannak.

II. A mikorrhizas szimbiózis vizsgálati rendszerének beállítása, alkalmazása

Vizsgálatainkhoz *Glomus intraradices* (DAOM 197198) törzset használtunk, melyet *in vitro* rendszerben, sárgarépa (*Daucus carotta* DC2-es vonal) transzformált, ún. „hairy-root” gyökerén tartottunk fenn folyamatos frissítés mellett, így mindig volt a kísérletekhez megfelelő mennyiségű és érettségű gombaspóránk. A kutató csoportunk birtokában lévő, újonnan izolált *M. truncatula Tnt1* inszerciós mutánsok, valamint a *lin* mutáns *M. truncatula* növény mikorrhizációs fenotípusának megállapítása folyamatban volt, de egy sajnálatos termosztát meghibásodás miatt a gombatenyésztetünk kiveszett. Így átmenetileg a kísérleteket leállítottuk, és külső forrásból (Glomeromycota In vitro Collection (GINCO), Belgium) próbálunk új inokulumot vásárolni, majd a laboratóriumunkban a tenyésztést és a kísérleteket újra beindítani.

A *LIN* gén izolálását, a *LIN* fehérje leírását, valamint a fentebb bemutatott komplementációs és hisztokémiai vizsgálatokat tudományos publikációban közöltük (E.Kiss, **B. Oláh**, P. Kaló, M. Morales, A. B. Heckmann, A. Borbola, A. Lózsa, K. Kontár, P. Middleton, J. A. Downie, G. E. D. Oldroyd and G. Endre: *LIN*, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by Rhizobia in legumes. *Plant Physiology* 151: 1239-1249, 2009 IF: 6,11).

Ezen kívül munkánkat nemzetközi konferencián is bemutattuk poszter formájában (The 16th International Congress on Nitrogen Fixation, Montana, Big Sky, 2009. június), valamint előadásban (The 15th International Congress on Nitrogen Fixation, Cape Town, 2007), mely anyag könyvfejezetként is megjelent egy (Endre G, Kiss E, Borbola A, Tiricz H, Lozsa A, **Olah B**, Kuppusamy K, Sharopova N, VandenBosch KA: The *Medicago truncatula lin* mutant: caught by map-based cloning characterised by transcriptomics *CURRENT PLANT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE SUSTAINABLE AGRICULTURE*, SPRINGER,2008. pp. 225-226.).

A pályázat során elvégzett, illetve elkezdett de még be nem fejezett publikálatlan eredményekről a kézirat készítése folyamatban van.