

A gümős-specifikus ciszteinben gazdag NCR peptidek evolúciója és funkcionális analízise

PhD értekezés

Lima Rui Dániel

Témavezető: Prof. Dr. Kondorosi Éva

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológia Intézet

2023

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	7
1.1. A nitrogén az élet nélkülözhetetlen eleme	7
1.2. Az ammónia ipari előállítása	7
1.3. A biológiai nitrogénkötés (BNF)	9
1.4. A pillangósvirágúak	11
1.4.1. Az inverted repeat-lacking klád (IRLC) és a <i>Medicago</i> nemzetség	0
1.5. Molekuláris párbeszéd a baktérium és a növény között	1
1.6. Az infekció és a szimbiózis kialakulása	3
1.7. A nitrogénkötő gümők fejlődése és formái	4
1.7.1. A gümő kialakulása	4
1.7.2. Gümőtípusok	5
1.8. A bakteroid differenciáció	7
1.9. A bakteroid differenciációt kiváltó növényi faktorok	9
1.9.1. A gümőspezifikus ciszteinben gazdag peptidek (NCR-ek)	10
1.9.2. Az NCR-ek kialakulása	12
1.9.3. Az NCR peptidek fizikokémiai tulajdonsága és ismert funkcióik.....	13
1.9.4. Az NCR-ek <i>in vitro</i> antimikrobiális hatása	14
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	15
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
3.1. Molekuláris biológiai módszerek	17
3.1.1. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)	17
3.1.2. Az RNS-interferencia vektorok előállítása	17
3.1.3. Az <i>NCR169</i> promótert tartalmazó vektorok előállítása.....	18
3.1.4. Transzkriptom-szekvenálás	18
3.2. Növényi munka	18
3.2.1. Magsterilizálás, csíráztatás, fertőzés	18
3.2.2. Tranziens transzgenikus vonalak előállítása.....	19
3.2.3. Stabil transzgenikus vonalak előállítása	19
3.3. Mikroszkópia	21
3.3.1. Mintaelőkészítés mikroszkópiához	21
3.3.2. Sztereo mikroszkópia	21
3.3.3. Konfokális mikroszkópia.....	22
3.3.4. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	22
3.3.5. Áramlási citometria (flow cytometry)	22
3.4. Biokémiai módszerek	22

3.4.1. GUS-festés.....	22
3.4.2. ER membrán-izolálás	23
3.4.3. Szimbioszóma membrán-izolálás.....	24
3.4.4. A szintetikus szignál peptidek és Western blot	25
3.4.5. HA jelölt szintetikus peptidek és <i>M. truncatula</i> gümőfehérjék kötődésének vizsgálata affinitás kromatográfiával	26
3.5. Antimikrobiális módszerek	26
3.5.1. Mikroba törzsek és peptidszintézis.....	26
3.5.2. A peptidek antimikrobiális aktivitásának vizsgálata	27
3.5.3. A peptidek biofilm bontásának vizsgálata.....	27
3.5.4. DNS-kötő vizsgálat	28
3.5.5. Humán vörösvérsejtek hemolízisének vizsgálata	28
3.6. Programok	28
4. EREDMÉNYEK.....	30
4.1. Az NCR-ek evolúciója	30
4.1.1. Az NCR szignál peptidek konzerválódása	30
4.1.2. Az érett NCR peptidek változatossága és strukturális jellemzői	32
4.1.2.1. Az NCR és NCR-szerű peptidek aminosav szekvenciájának összehasonlítása	34
4.1.3. Az NCR-ek ko-evolúciója a gümőspecifikus szignál peptid peptidázal.....	35
4.2. Az NCR247 hatásmechanizmusa	39
4.3. Az NCR gének működésének szabályozása	41
4.4 Az SPP szerepe a gümőfejlődésben.....	43
4.4.1. A gümőspecifikus szignál peptid peptidáz gén elcsendesítésével a gümő Fix ⁻ -á válik.....	43
4.4.2. A rizs SPP (OsSPP) komplementálja a nodSPP hiányát	46
4.4.3. nodSPP RNSi gümő transzkriptom analízise	47
4.4.4. A gümőspecifikus szignál peptid peptidáz (nodSPP): összefoglalás	49
4.5 Az NCR SP-k SPP szubsztrátok.....	49
4.5.1. A szignál peptid peptidáz (SPP).....	49
4.5.2. Az izolált ER-ben lévő SPP hasítja a szubsztrát NCR SP-eket.....	51
4.5.3. Az NCR szignál peptidek fehérje kölcsönhatásának vizsgálata: az SPP szubsztrát és nem- szubsztrát SP-k más fehérjéket kötnek	53
4.5.4. Az NCR szignál peptidek: összefoglalás.....	55
4.6. Az NCR-ek antimikrobiális hatása	56
4.6.1 Az NCR-ek antimikrobiális hatása humán patogén baktériumokkal szemben.....	56
4.6.2. Az NCR-ek antimikrobiális hatásmechanizmusát befolyásoló fizikokémiai tulajdonságok.....	60
4.6.3. Az IRLC NCR peptidek képesek a <i>C. albicans</i> biofilm lebontására.....	62
4.6.4. Az IRLC NCR-ek membrán átjárhatóságot, morfológiai változást és sejthalált okoznak <i>A.</i> <i>baumannii</i> -nál és <i>C. albicans</i> -nál	63
4.6.5. Kationos NCR peptidek kötnek és aggregálják a DNS-t	65

4.6.6. Az IRLC NCR peptidek és származékaik nem okozták a humán vörösvérsejtek hemolízisét	67
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	68
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	73
ÖSSZEFOGLALÁS.....	74
SUMMARY	77
IRODALOMJEGYZÉK.....	80
FÜGGELÉKEK.....	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMP	antimikrobiális peptid (antimicrobial peptide)
A17	<i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 ökotípus (vad típus)
BacA	bakteriális ABC-transzporter, szimbiotikus szerepe az NCR-ek felvétele a sejtbe
BclA	a BacA ortológja a <i>Bradyrhizobium</i> nemzetségben
BNF	biológiai nitrogénkötés (biological nitrogen-fixation)
BNM	buffered nod medium: alacsony nitrogéntartalmú növényi táp
bp	bázispár (basepair)
CaML	szimbiotikus kalmodulinszerű protein (calmodulin-like)
cDNS	komplementer DNS (complementer DNA, copy DNA, cDNA)
cds	kódoló DNS-szekvencia (coding DNA sequence)
ctrA	a sejtosztódást szabályozó bakteriális fehérje
DDM	Dodecyl β -D maltoside: detergens
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
dnaA	a bakteriális DNS-origóhoz kötődő és a replikációt megindító bakteriális fehérje, aktiválja a <i>gcrA</i> expresszióját
<i>dnf</i>	defective in nitrogen-fixation 1, nitrogénkötésre képtelen-mutáns 1
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid, DNA)
dpi	nappal a fertőzést követően (days post inoculation)
dsDNS	kettősszálú DNS (double stranded DNA)
DTT	1,4-dithiothreitol: redukálószer
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
EPS	exopoliszacharid
ER	endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z: szerepe a bakteriális sejtosztódás megindítása
genSPP	általános SPP (general SPP), Medtr3g109932
<i>gcrA</i>	a sejtosztódást szabályozó bakteriális fehérje, aktiválja a <i>ctrA</i> expresszióját
GroEL	bakteriális chaperon (dajkafehérje), chaperonin: szerepe a helyes fehérjetekeredés (folding) elősegítése és javítása
GRP	gümőspecifikus glicinben gazdag fehérje (nodule-specific glycine-rich protein)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, puffer
Hrrp	host range restriction peptidase, bakteriális peptidáz, kompatibilitási faktor

ICS	infekciós csepp (infection droplet)
IF	infekciós fonál (infection thread, IT)
IR	inverted repeat
IRLC	inverted repeat-lacking klád (inverted repeat-lacking clade)
IZ	átmeneti zóna, interzóna (Zone II-III, interzone): a gümő átalakulási zónája
KPS	kapszuláris poliszacharid
Lj	<i>Lotus japonicus</i> , <i>L. corniculatus subsp. japonicus</i> , szarvaskerep (Robinoid)
Ljubq10	<i>Lotus japonicus</i> ubiquitin 10
LPS	lipopoliszacharid
MBC	minimális baktericid koncentráció (minimal bactericidal concentration)
MFC	minimális fungicid koncentráció (minimal fungicidal concentration)
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA, mRNA)
Ms	<i>Medicago sativa</i> , takarmánylucerna (IRLC)
Mt	<i>Medicago truncatula</i> (IRLC)
N	nitrogén (nitrogen)
N ₂	dinitrogén (dinitrogen)
NC	nettó töltés (net charge)
NCBI	National Center for Biotechnology Information database
NCR	gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptid (nodule-specific cysteine-rich peptide): az IRLC növényekben fejeződnek ki
NCR 4C	négy konzervált ciszteint tartalmazó NCR
NCR 6C	hat konzervált ciszteint tartalmazó NCR
NCRL	NCR-szerű (NCR-like): a nem IRLC növényekben fejeződnek ki
NCRL 6C	hat konzervált ciszteint tartalmazó NCRL
NCRL 8C	nyolc konzervált ciszteint tartalmazó NCRL
NH ₃	ammónia (ammonia)
NH ₄ ⁺	ammóniumion (ammonium ion)
nodSPP	gümőspecifikus SPP (nodule-specific SPP), Medtr1g008280
PBM	peribakteroid membrán (peribacteroid membrane)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chainreaction)
pI	izoelektromos pont (isoelectric point)
PI	propídium-jodid fluoreszcens festék (élő-halott festés esetén: piros/halott)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride)

PR10	patogenezishez kapcsolható fehérje 10, Medtr2g035130
R gén	rezisztencia gén
Rm41	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm41 rhizobium törzs (vad típus)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid, RNA)
RNSi	RNS-interferencia (RNA-interference, RNAi)
RSD	szimbiószóma kialakulásának szabályozója, regulator of symbiosome differentiation, Medtr7g063220
RT-qPCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)
R108	<i>Medicago truncatula</i> R108 ökotípus (vad típus)
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)
Smc03872	bakteriális peptidáz, kompatibilitási faktor
Sm1021	<i>Sinorhizobium meliloti</i> Sm1021 rhizobium törzs (vad típus)
SP	szignál peptid (signal peptide)
SPC	szignál peptidáz komplex (signal peptidase complex)
SPP	szignál peptid peptidáz (signal peptide peptidase)
SPPL	SPP-szerű (signal peptide peptidase-like, SPP-like)
SRP	signal recognition particle
symCRK	szimbiotikus ciszteinben gazdag receptorszerű kináz, Medtr3g079850
SYTO 9	SYTO 9 fluoreszcens festék (élő-halott festés esetén: zöld/élő)
TF	transzkripció faktor (transcription factor)
Tg	megatonna, teragramm, 10^{12} gramm
TM	transzmembrán (transmembrane)
TMD	transzmembrán domén (transmembrane domain)
UTR	nem transzlálódó régió (untranslated region)
VLCFA	nagyon hosszú láncú zsírsavak (very-long-chain fatty acids)
WSM419	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 rhizobium törzs (vad típus)
ZI	egykes zóna (Zone I, meristematic zone): a gümő merisztematikus zónája
ZII	kettes zóna (Zone II, infection zone): a gümő infekciós zónája
ZII _d	kettes zóna disztális része (Zone II, distal): a ZII gümőcsúcs felé eső része
ZII _p	kettes zóna proximális része (Zone II, proximal): a ZII gyökér felé eső része
ZIII	hármask zóna (Zone III, nitrogen-fixing zone): a gümő nitrogénkötő zónája
ZIV	négykes zóna (Zone IV, senescence zone): öregedési zóna
(Z-LL) ₂	(Z-LL) ₂ keton: SPP gátló lipidszerű vegyület (SPP inhibitor)
2HA	<i>Medicago truncatula</i> Jemalong 2HA ökotípus (vad típus)

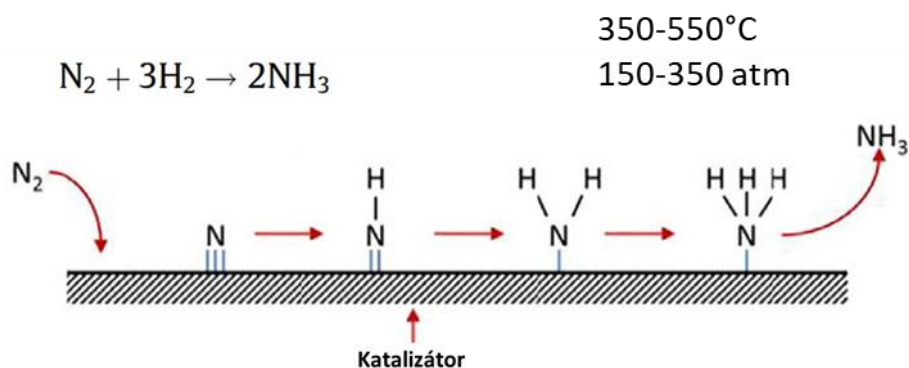
1. BEVEZETÉS

1.1. A nitrogén az élet nélkülözhetetlen eleme

A nitrogén (N) elsődleges biogén elem, mely minden élőlény számára nélkülözhetetlen, az aminosavak (fehérjék) és a nukleotidok (DNS, RNS) alkotórészeként. A Föld légkörének 78%-a dinitrogén gáz (N_2), amit néhány baktérium és archea kivételével sem az eukarióta szervezetek, így a növények, az állatok és a gombák, de más prokarióták sem tudnak hasznosítani. A N-t a növények ammónia vagy nitrát formájában képesek a talajból felvenni, és beépíteni makromolekulákba, majd a nitrogén a növények elfogyasztásával jut az állatokba és végső soron az emberekbe. Ammónia és nitrát abiotikus úton elsősorban villámlás során keletkezik (az évente megkötött N 5%-a). A légköri nitrogént kizárólag egyes prokarióták (baktérium, archaee), az úgynevezett diazotrófok képesek redukálni és a táplálékláncba vinni (Lehnert és mtsai., 2018).

1.2. Az ammónia ipari előállítása

Az ammónia (NH_3) előállításának módszerét Fritz Haber (1868–1934) dolgozta ki 1909-ben, majd a BASF német vegyipari vállalat megbízásából Carl Bosch-sal (1874–1940) kifejlesztették annak ipari előállítását 1913-ra. A dinitrogén gáz hármaskötésének megbontása és ammóniává (NH_3) redukálása magas hőmérsékleten ($500^\circ C$, manapság $350-550^\circ C$), nagy atmoszférikus nyomáson (eredetileg 200 atm, manapság 150-350 atm) és katalizátorok jelenlétében (kezdetben vasat használtak, manapság vasat, ruténiumot, kobaltot, nikkelt és fémnitrideket, gyakran egyéb ko-katalizátorokat is) történik egy térfogat N_2 és 3 térfogat H_2 felhasználásával (1. ábra) (Wang és mtsai., 2018; Humphreys és mtsai., 2021). Haber 1918-ban az „ammónia elemeiből történő szintéziséért”, Bosch 1931-ben „a nagynyomású kémiai eljárások feltalálásért és kidolgozásáért” kapott kémiai Nobel-díjat.



1. ábra. Ammónia ipari előállítása Haber-Bosch kémiai reakcióval nagy nyomáson, magas hőmérsékleten, katalizátorok használatával. Eredeti ábra: Wang és mtsai., 2018.

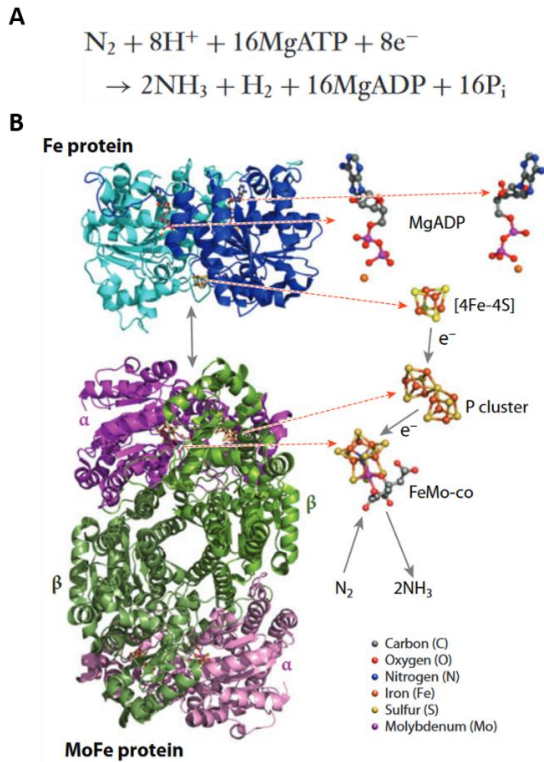
Az ipari mennyiségben előállított és felhasználható ammónia és az ebből származó nitrogénműtrágyák mezőgazdasági forradalmat indítottak el, mely nagy mennyiségű élelmiszer előállítását tette lehetővé, így elsősorban ennek köszönhetően a világ népessége az azóta eltelt száz év alatt megnégyesződött, az akkori 1,8 milliárd főről a jelenlegi 8 milliárd főre ugrott. Az elfogyasztott fehérje 40%-a a Haber–Bosch reakcióból keletkező ammóniából ered és a jelenleg élő emberek 48%-a a Haber–Bosch reakciónak köszönheti a létét (Erisman és mtsai., 2008). A Földön évente megkötött N 413 megatonnára (Tg, teragramm, 10^{12} gramm) tehető, amiből 198 Tg-t a természetben élő nitrogénfixáló úgynevezett diazotróf mikroorganizmusok kötnék meg (140 Tg óceáni, 58 Tg szárazföldi), 5 Tg abiotikus, míg 210 Tg antropogén eredetű, azaz emberi tevékenységből származik. Ez utóbbiból 120 Tg-t a műtrágyagyártás tesz ki, 60 Tg-t az agráriumban növe, biológiai nitrogénkötésre (BNF) képes élőlények, elsősorban a hüvelyesek szimbiótái kötnék meg, 30 Tg közvetlenül a környezetszennyezésből ered (gyárak, közlekedés) (Chen és mtsai., 2021).

Az NH_3 előállítása a világ energiaszükségletének közel 2 %-át teszi ki, ezzel jelentősen terhelve a környezetet, hisz az energiaszektor 80%-a fosszilis üzemanyagok elégetésén alapul, így ez a folyamat az össz- CO_2 -kibocsátás 3%-áért felelős (Milton és mtsai., 2017). A mezőgazdasági termelésből évente 48 Tg antropogén eredetű reaktív N jut a légkörbe NH_3 , nitrogén-monoxid (NO) és dinitrogén-oxid (N_2O) formájában. Az N_2O a legveszélyesebb, ami száz évig is megmarad a légkörben, üvegházhatása 300-szor hatékonyabb a CO_2 -nál, és az üvegházhatás 6%-áért teszik felelőssé, míg a többi reaktív N az egészségre káros aeroszolok formájában kerül a levegőbe. A mezőgazdasági területeken műtrágyaként használt N 41%-a a szennyezőanyag formájában kerül a környezetbe, míg további 21% emberi étkezésre és takarmányozásra nem használható hulladék. Ezek mellett még a raktározás és szállítás során

keletkező veszteségek, valamint az emberi pazarlás miatt a mezőgazdaságban felhasznált N 22-23%-át fogyasztja el valójában az ember (Erisman és mtsai., 2008; Fowler és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2016; Smil, 2002).

1.3. A biológiai nitrogénkötés (BNF)

A légköri dinitrogén biológiai megkötésére a nitrogenáz enzimkomplex képes, amely azonban csak a diazotróf szervezetekben, a Bacteria és az Archaea egyes doménjeiben található meg. A nitrogenáz enzim valószínűleg egy a hidrogén-cianid redukálására képes detoxifikáló reduktázból alakult ki, majd az ebből kifejlődő nitrogenáz enzimkomplex terjedt el vertikálisan és horizontálisan, illetve veszett el számtalanszor az evolúció folyamán (Hartmann és Barnum, 2010). A dinitrogén hármas kötésének biológiai felbontása és ammóniává alakítása légköri nyomáson és a talajban előforduló hőmérsékleten történik 16 ATP molekula felhasználásával, mely folyamat során a nitrogenáz enzimkomplex a katalizátor szerepét tölti be (2A. ábra). A nitrogenáz két komponensből áll; a homodimerként működő Fe fehérjéből, amit a *nifH* gén kódol, és a heterotetramer MoFe fehérjéből, amelynek két alfa (α) alegységét a *nifD*, két béta (β) alegységét a *nifK* gén kódolja. Az Fe fehérje a vas-kén klaszterén [4Fe-4S] redukálószer jelenlétében (ami fajtól függően ferredoxin vagy flavodoxin) két MgATP-t két MgADP-re hidrolizál, majd az így felszabaduló elektron kerül át a MoFe fehérjére. A MoFe fehérje két katalikus egységből áll (két $\alpha\beta$ -egység), melyek tartalmazzak egy-egy P és FeMo klasztert: az előbbi klaszter továbbítja a Fe fehérje által leadott elektront az utóbbinak. A FeMo klaszter és a hozzá kapcsolódó kofaktor együttese (FeMo-co) köti meg a szubsztrátot (N_2) és itt történik meg az N_2 redukciója, ami ammóniát eredményez (Seefeldt és mtsai., 2009). A kofaktor a homocitrát, aminek az előállítására a legtöbb rhizobium baktérium képtelen a homocitrát-szintáz gén (*nifV*) hiánya miatt, amelyet a szimbiotikus partner biztosít (Hakoyama és mtsai., 2009; Nouwen és mtsai., 2017).

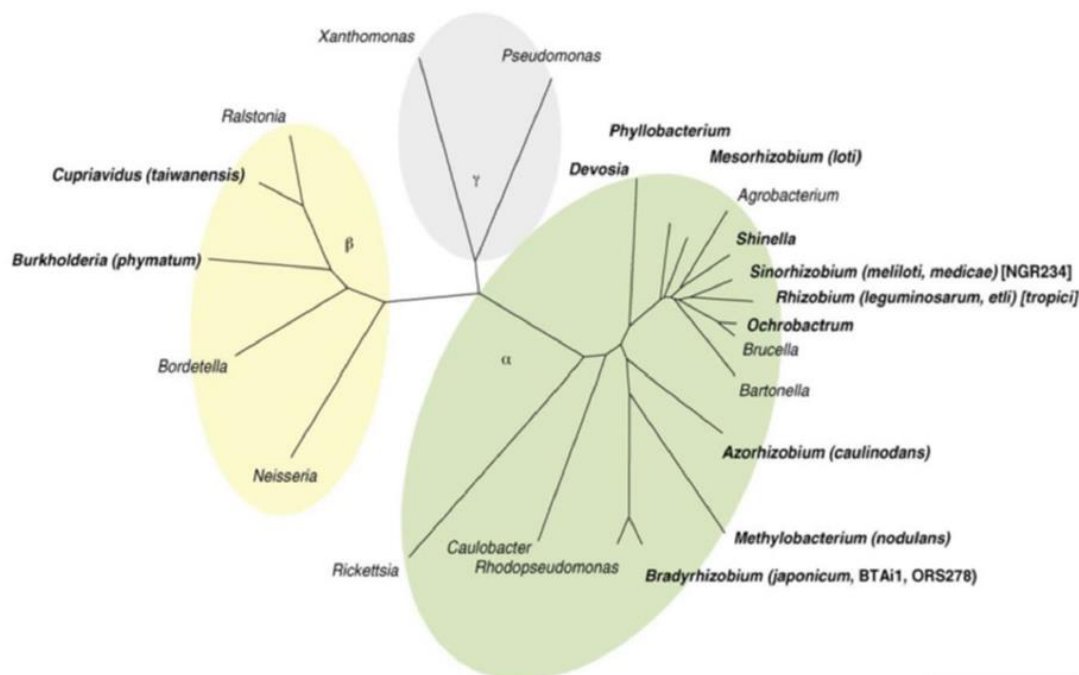


2. ábra. A nitrogénáz enzimkomplex felépítése és működése.

A. A nitrogénáz enzimkomplex által katalizált reakció. **B.** A nitrogénáz enzimkomplex két alegysége, a homodimer Fe fehérje (kék) és a tetramer MoFe fehérje (α alegység: rózsaszín, β alegység: zöld), amelynek FeMo-kofaktorán (FeMo-co) történik meg a légköri nitrogén ammóniává történő redukciója. (Seefeldt és mtsai., 2009 ábrái).

A legtöbb rhizobiummal ellentétben a nem szimbiotikus diazotróf baktériumok rendelkeznek a nitrogénáz enzimkomplex szintéziséhez szükséges összes génnel, és így szabadonélő formában kötik meg a N-t és juttatják azt a táplálékláncba, és sokuk, melyek endofitaként a növények szállítónyalábjában élnek, mindezt még hatékonyabban teszik meg (Kennedy és mtsai., 2004).

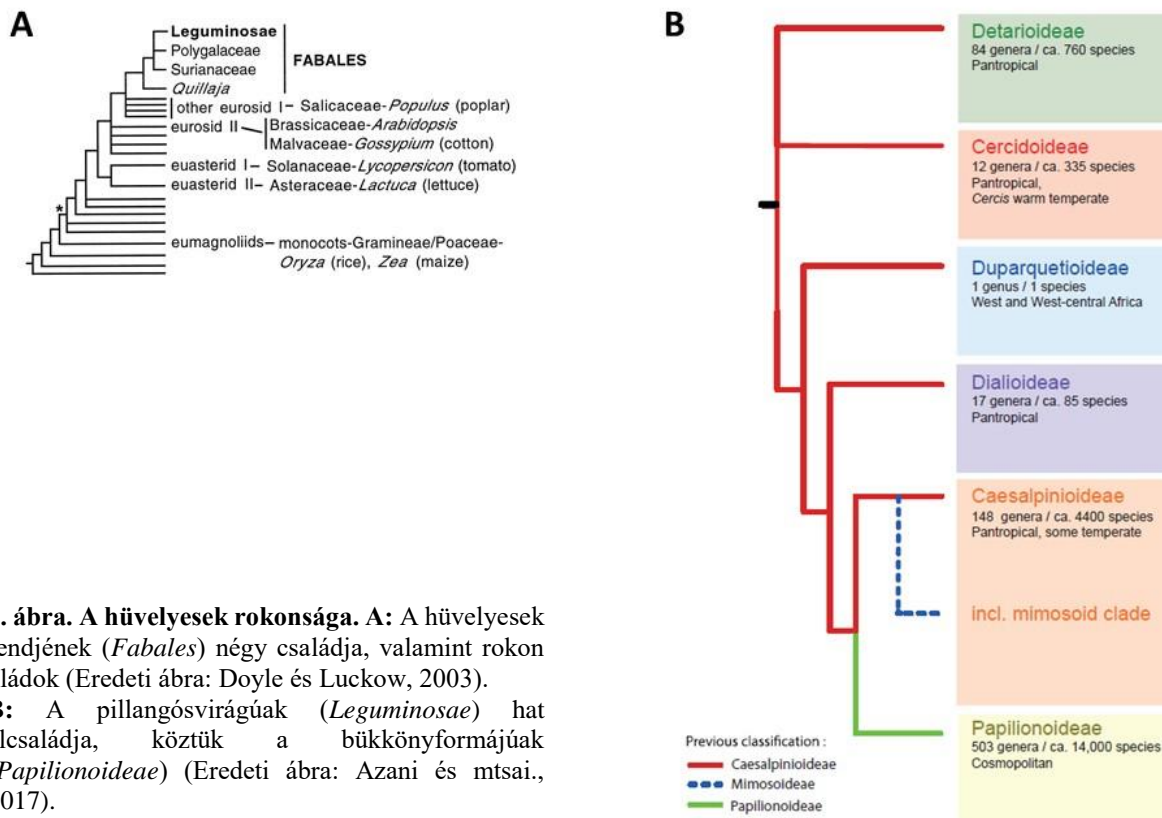
Nitrogénkötő szimbiózis legalább hatszor alakult ki a szárazföldi növényeknél (Delaux és mtsai., 2015). A nitrogénkötésre alkalmas szimbiotikus szerv, a gümő létrehozására csupán a Rosid kládon belüli monofiletikus nitrogénkötő klád négy rendjének (*Cucurbitales*, *Fabales*, *Fagales*, *Rosales*) huszonnyolc családja közül tíz képes, és azoknál sem mindegyik faj (Griesmann és mtsai., 2018; Soltis és mtsai., 1995). Az ősi szimbióta a Frankia (sugárgomba) lehetett, és még ma is az az aktinorhizás szimbiózisnál, de ezeket a Gram pozitív baktériumokat az ősi hüvelyesekben és a *Parasponia* nemzetségben (*Rosales*) egymástól függetlenül leváltották a Gram negatív rhizobiumok (Mergaert és mtsai., 2020; van Velzen és mtsai., 2019). A rhizobium parafiletikus csoportot szimbiózisra képes alfa-proteobaktériumok (*Rhizobiales*) és béta-proteobaktériumok (Burkholderiales) alkotják; jelentős nemzetségei az *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* és *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (3. ábra) (Hassen és mtsai., 2020).



3. ábra. Nitrogénkötő baktériumok az α - és β -proteobaktériumok között. A proteobaktériumok filogenetikai fája 16S rRNS génszekvenciák alapján készült. α : alfa-proteobaktériumok, β : béta-proteobaktériumok, γ : gamma-proteobaktériumok. A vastag betűvel kiemelt nemzetségek fajai közt vannak nitrogénkötő rhizobiumok. (Hassen és mtsai., 2020 ábrája)

1.4. A pillangósvirágúak

A hüvelyesek (*Fabales*) rendje négy családot foglal magába (*Fabaceae*, *Polygalaceae*, *Quillajaceae*, *Surianaceae*), de ezek közül jelentőségükben messze kiemelkednek a pillangósvirágúak (*Fabaceae* vagy *Leguminosae*) (4. ábra), melyek a perjefélék (*Poaceae* vagy *Gramineae*) után a legfontosabb haszonnövényeink. A *Fabaceae* család 800 nemzetséget számlál 20000 fajjal, melyek 88%-a képes szimbiózist kialakítani talajlakó rhizobium baktériumokkal. Az emberiség fehérjeigényének 33%-át fedezik, de előállítanak belőlük feldolgozott növényi olajokat és állati takarmányként is rendkívül fontosak, továbbá egyes trópusi fás fajok az erdőgazdálkodásban hasznosíthatók. Ismert pillangósvirágúak a borsó, csicseriborsó, bab, lóbab, szójabab, lencse, földimogyoró, fehér here, lucerna, rooibos, fehér akác (*Papilionoideae*, bükkönyformák), valamint az akácia és a mimóza (*Caesalpinioideae*, lepényfaformák) (Graham és Vance, 2003; Stagnari és mtsai., 2017).



4. ábra. A hüvelyesek rokonsága. A: A hüvelyesek rendjének (*Fabales*) négy családja, valamint rokon kládok (Eredeti ábra: Doyle és Luckow, 2003). **B:** A pillangósvirágúak (*Leguminosae*) hat alcsaládja, köztük a bükkönyformájúak (*Papilionoideae*) (Eredeti ábra: Azani és mtsai., 2017).

A bükkönyformák szimbiótái a Rhizobiales rendből (α -proteobaktériumok) kerülnek ki, míg a lepényfaformák (*Caesalpinioideae*) gümőiben a Burkholderiales fajok (β -proteobaktériumok) találhatóak meg, de például az egymással közeli rokon bükkönyforma rooibos (*Aspalathus linearis*) és mézbokor (*Cyclopia* spp.) gümőiben mindkét csoport fajait sikerült azonosítani (Brink és mtsai., 2017; Hassen és mtsai., 2020).

1.4.1. Az inverted repeat-lacking klád (IRLC) és a *Medicago* nemzetség

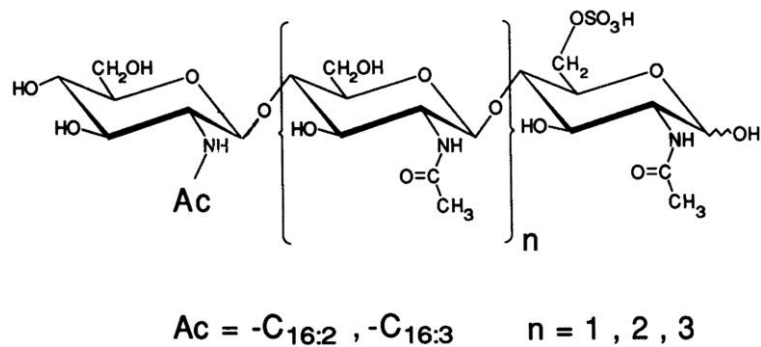
A szárazföldi növények (kloro)plasztisza általában 115-118 egyedi gént tartalmaz, melyek közül körülbelül 17 (minimum 4 riboszómális RNS és 5 transzfer RNS gén) megduplázódott, majd az újonnan kialakult szakasz fordított orientációban beépült a plasztisz genomba egy hosszú inverted repeat (IR) formájában. Mivel az IR nem esszenciális és feltételezhetően csupán a plasztisz genom stabilitásához járul hozzá, ezért az evolúció során többször is részlegesen vagy teljesen elveszett. Elsőként ennek az IR-nek a hiányát a borsónál (*Pisum sativum*) írták le, majd a rokonságát feltérképezve alkották meg az IRLC (inverted repeat-lacking clade) monofiletikus kládot, ami további gazdaságilag jelentős növényeket tartalmaz,

úgy mint a csicseriborsó (*Cicer arietinum*), a lencse (*Lens culinaris*), a lóbab (*Vicia faba*), valamint a here (*Trifolium* spp.) és a lucerna (*Medicago sativa*), amik fontos állati takarmánynövények. Az IRLC 37-38 millió évvel ezelőtt válhatott el a Robinoid testvércsoporttól, melynek ismertebb képviselői a fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) és a modellnövény szarvaskerep (*Lotus japonicus* vagy *Lotus corniculatus subsp. japonicus*) (Wojciechowski és mtsai. 2000; I.-S. Choi, Jansen, és Ruhlman 2019).

A *Medicago* nemzetség 87 faja közül több polyploid, a lucerna maga is tetraploid (haploid kromoszómaszám, N=16), míg közeli rokona, az *M. truncatula* diploid (N=8) (Steele és mtsai., 2010) és a genomja is harmadakkora (500 millió bp), mint a lucernának (1600 millió bp) (Choi és mtsai., 2004). Emellett a *M. truncatula* gyorsan növő, igénytelen növény, mely önbeporzó, és alkalmas genetikai vizsgálatokra, agrobaktérium általi génbevitelre, valamint egyes ökotípusainál (R108, 2HA) stabil transzgenikus növények létrehozására (Hoffmann és mtsai., 1997; Crane és mtsai., 2006; Cosson és mtsai., 2015), így kiváló modellnövénye az IRLC-nek és a pillangósvirágúaknak.

1.5. Molekuláris párbeszéd a baktérium és a növény között

A szimbiózis gazdaspecifikus, amely csak adott pillangós gazdanövény és baktérium faj között alakul ki, és egymás felismerése, valamint a gümőfejlődés a növény és a baktériumok közti folyamatos „molekuláris párbeszeden” alapul. Az éhező, N-hiányos növény specifikus, az adott fajra vagy alfajra jellemző flavonodiokat, illetve izoflavonoidokat bocsát ki a rizoszférába, amelyek beindítják a kompatibilis rhizobium partnerben a gümőfejlődésért felelős nodulációs gének működését, melyek válaszul a szimbiózist és gümőfejlődést kiváltó specifikus Nod-faktorokat termelik. A Nod-faktorok lipo-kitoooligoszacharidok, amelyek általában 4 vagy 5 N-acetil-D-glükózamin egységből állnak, és a terminális cukrokon található módosítások (különböző hosszúságú és telítetlenségű acil lánc a nem redukáló végen és változatos szubsztitúciók a redukáló végen, például acetil, szulfát, metil, fukozil) szabják meg a specifitásukat, vagyis, hogy melyik pillangós virágú növényvel létesítenek szimbiózist (Geurts és Bisseling, 2002; Lerouge és mtsai., 1990; Schultze és mtsai., 1992) (5. ábra).



5. ábra. A *Sinorhizobium meliloti* 1021 Nod faktor család (Schultze és mtsai., 1992)

Az Sm1021 Nod-faktor egy 6-*O*-szulfatált-*N*-($C_{16:2}$)acil-tri-*N*-acetyl- β -1,4-D-glükózamin penta-, tetra- vagy triszacharid ($n=1, 2, 3$), aminek a *S. meliloti*-ra jellemző gazdaspecificitást eredményező módosításai a redukáló cukorhoz kapcsolódó szulfátcsoport, a nem redukáló cukorhoz kapcsolódó acetylcsoport (ritkábban csupán egy hidrogén) és a C16 hosszúságú telítetlen acil lánc.

A konzerválódott cukorváz felépítésért a közös *nodABC* gének felelősek, míg a gazdaspecificitásért felelős módosításokat a rhizobiumok további *nod*, *noe* és *nol* géneinek géntermékei határozzák meg (Kondorosi és mtsai., 1984). A *nod* géneket a gazdanövényből származó flavonoid jelenlétében a NodD transzkripció faktor aktiválja a *nod* operonok promóterében található *nod*-boxhoz kötődve (Rostas és mtsai., 1986; Kondorosi és mtsai., 1989). A NodD a prokariótákban leggyakrabban előforduló LysR-típusú transzkripció regulátorok csoportjába tartozik. Az összes gümözésre képes rhizobiumban megtalálhatók a *nodABC* gének, legtöbbször egy operonként, melyek géntermékei közül a NodC enzim szintetizálja a kitoooligoszacharid vázat, aminek a nem-redukáló végét deacetylálja a NodB, majd ezt *N*-acetylálja a NodA enzim. Szintén általános a *nodIJ* gének jelenléte, melyek a Nod-faktorok szekréciójában részt vevő ABC-transzportereket kódolják. A többi *nod* gén által kódolt enzimek fajspecifikus módosítások szintézisét és transzferét végzik: a *nodH* és a *nodPQ* *O*-szulfatál, a *nodL* *O*-acetylál, a *nodS* *N*-metilál, a *nodZ*, a *noeKL* és a *nolK* fukozilál, míg a *nodEF* többszörösen telítetlen zsírsavakkal módosítja a kitoooligoszacharidot. Az összes gén esetében léteznek allélikus variációk, így az ortológok nem feltétlenül cserélhetők fel egymással (esetleg még a *nodABC* esetében sem), akár az egy fajba tartozó különböző törzsek között sem (Mergaert és mtsai., 1997).

Míg a legtöbb rhizobium csak egy vagy néhány növény-fajjal és ökotípussal képes szimbiózist kialakítani, vannak promiszkuus rhizobiumok is, amelyek többféle Nod-faktort termelnek, és így több hüvelyes növény szimbiotikus partnerei (Mergaert és mtsai., 2006; Teamtisonng és mtsai., 2014). Az eddig ismert rhizobiumok közül a *Sinorhizobium fredii* NGR234 képes a legtöbb, legalább 136 növényen működőképes gümőt létrehozni, amit

valószínűleg a többféle általa termelt Nod-faktor mellett a szekréciós rendszereinek és transzportereinek is köszönhet (Pueppke és Broughton, 1999; Schmeisser és mtsai., 2009). A *nod* gének szimbiotikus plazmidokon vagy mobilis szimbiotikus szigeteken találhatóak, amelyek átadása konjugáció során akár különböző rhizobium nemzetségek között is lehetséges (Keet és mtsai., 2017).

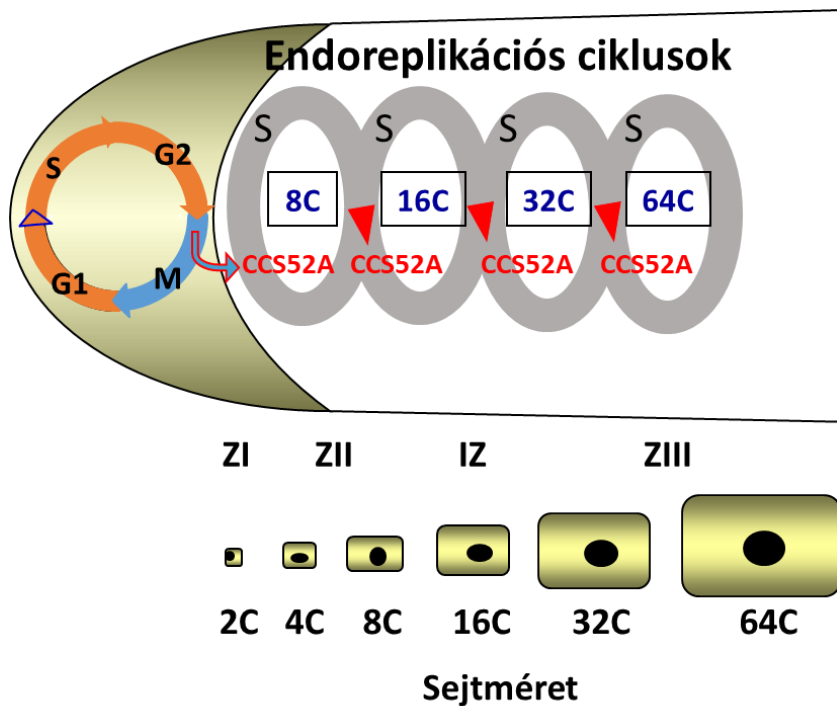
1.6. Az infekció és a szimbiózis kialakulása

A rhizobiumok a gazdanövény gyökerén a növekvő gyökérszőrökkel lépnek először kapcsolatba. A gyökérszőrökhöz tapadva megváltoztatják a gyökérszőr növekedésének irányát, amely „pásztorbotszerű” görbülésével magába zárja a baktériumokat. Innen, a gyökérszőrben a növény által kialakított tömlőn, az infekciós fonálon (IF) keresztül jutnak a baktériumok a gyökér belsejébe, ahol egyidejűleg a kéregsejtek osztódása indul meg és amelyből gümő primordium jön létre (Oldroyd és Downie, 2008). Az IF a gyökérszőr betüremkedésével jön létre, kívülről sejtfal határolja, míg belsejében a baktériumok a membránnal körülvett IF mátrix anyagába ágyazódva helyezkednek el és osztódnak (Dixon, 1967). A fiatal gümősejtekbe belépő IF sejtfala felbomlik, kiengedve a membránburkolta infekciós cseppet (ICS), benne a mátrixba ágyazott baktériumokkal. Az ICS elbomlása után a baktériumok a plazmamembránba burkolva jutnak be a növényi sejt citoplazmájába (Ivanov és mtsai., 2012). A folyamat során a rhizobium felhasználja a szabadon élő formájában felhalmozott polyhydroxybutyrátot, amely fontos tápanyag, habár nem nélkülözhetetlen eleme a sikeres infekció kialakításának (Muller és Denison, 2018). Az így kialakuló sejtszervecskeszerű képződmény a szimbioszóma, ahol a növényi eredetű szimbioszóma-membrán (más néven a peribakteroid membrán, PBM) burkolja a szimbiotikus baktériumot, a bakteroidot (Gavrin és mtsai., 2017). A PBM egy határfelület a baktérium és a növény között, elkülönítve a két szimbiotikus partnert, és megvédve a baktériumot a gazdaszervezet immunrendszerétől (Catalano és mtsai., 2004a). A PBM-on keresztül történik a metabolitok cseréje: a növény adja a malátot mint energiaforrást a nitrogén redukálásához, továbbá a nitrogenáz enzimkomplex működéséhez szükséges homocitrátot, valamint egyéb, a szimbióta számára fontos tápanyagokat, míg a bakteroid, kifejlett állapotában, szolgáltatja a sejten belül megkötött nitrogént ammóniumion (NH_4^+) formájában, amit a növény azonnal glutaminná (Gln, Q) alakít a citoplazmájában (Clarke és mtsai., 2014).

1.7. A nitrogénkötő gümők fejlődése és formái

1.7.1. A gümő kialakulása

A bakteriális Nod-faktorok a növény Nod-faktor receptoraihoz kötődve egy jelátviteli útvonalat aktiválnak a gyökérszőrökben, melynek hatására a *M. truncatula* gyökér belső-középső kérgében (kortexében) termelődő citokinin hormon beindítja a sejtek osztódását, és ezzel a gümő primordium formálódását, amelyből egy perzisztens, állandó méretű apikális merisztéma jön létre. A gümőmerisztémából folyamatosan kilépő sejtek lépcsőzetes differenciálódási folyamaton mennek át, ami eltérő funkciójú és morfológiájú gümő zónákat hoz létre. A merisztémából (egyres zóna, ZI) kilépő sejtek többször nem osztódnak, viszont miután megfertőződtek az IF-ból kiszabaduló szimbioszómákkal, egymást követő endoreduplikációs ciklusok révén genomméretük 2C DNS tartalomról (1C a haploid genom ploidiásintje) 4C, 8C, 16C, 32C majd 64C-re növekszik, ami a sejt méret egyre nagyobb növekedését teszi lehetővé (Cebolla és mtsai., 1999). *Medicago* gümők esetében a 32C-64C ploidiásint körülbelül 80-szoros sejt méret-növekedést eredményez a merisztematikus sejtekhez képest (Kondorosi és Kondorosi, 2004; Kondorosi és mtsai., 2013). A mitotikus sejt ciklusból az endociklusba való átlépést a CCS52A fehérje, az anafázis-promótáló komplex, az APC E3 ubiquitin ligáz szubsztrát-specifikus aktivátora váltja ki a mitotikus ciklinek korai degradációjával. Ez gátolja a mitózist és a sejt osztódást, miközben a DNS-szintézis folytatódik, így a genom az endoreduplikáció minden ciklusa során megduplázódik (Cebolla és mtsai., 1999). Amennyiben a CCS52A hiányában az endociklus gátlódik, a gümő differenciálódása elmarad, ami igazolja az endoreduplikáció fontosságát a gümőfejlődésben (Vinardell és mtsai., 2003) (6. ábra). Ennek magyarázatát a gümőspecifikus gének expressziójához szükséges ploidiásint-függő, jellegzetes epigenetikai változások adták (Nagymihály és mtsai., 2017).

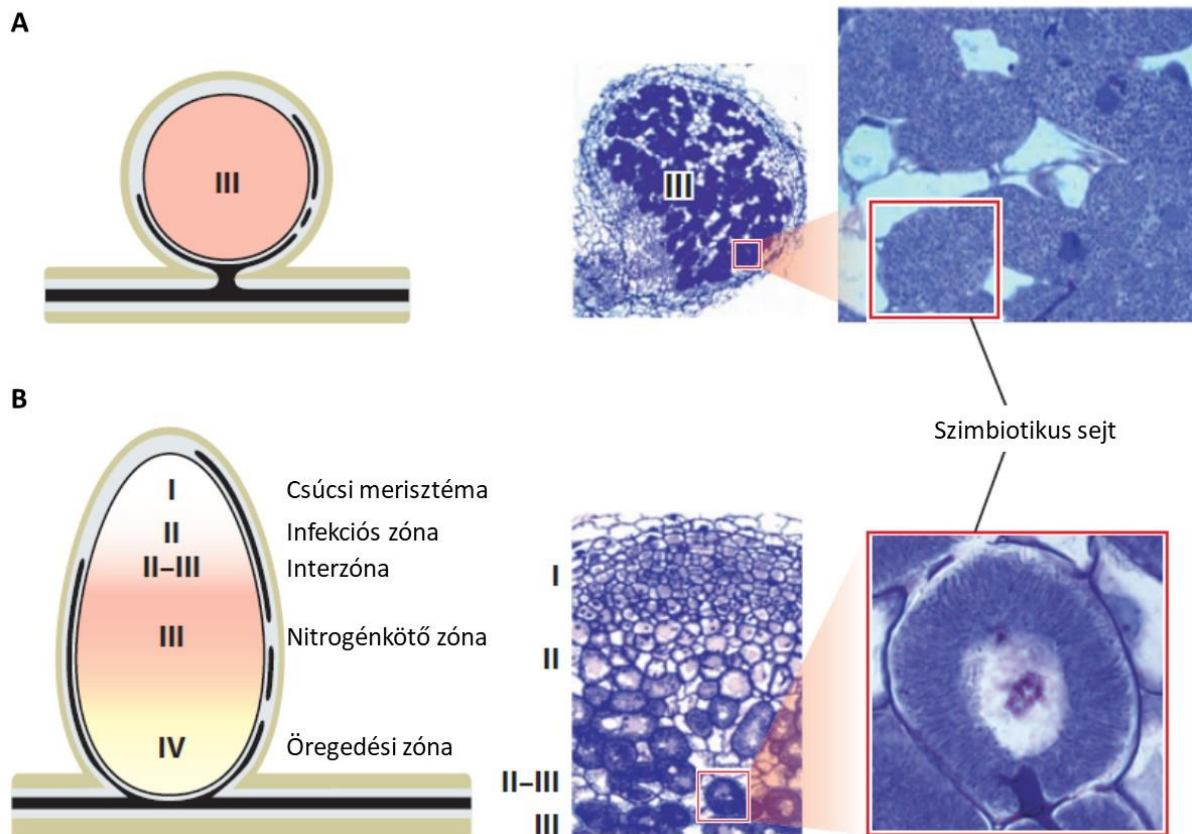


6. ábra. A sejtciklus szabályozása a gümőfejlődés során.

A G1, S, G2 és M fázisú mitotikus ciklus biztosítja a sejtek proliferációját a merisztémában (ZI). A mitotikus ciklusból való kilépést és az endoreduplikációs ciklusok létrejöttét a CCS52A fehérje biztosítja a mitotikus ciklinek azonnali lebontásával, ezzel gátolva a mitózist, miközben a DNS minden ciklusban megduplázódik, sejtméret-növekedést idézve elő.

1.7.2. Gümőtípusok

Alapvetően kétféle gümőtípust különböztetünk meg, a determináltat, ahol a gümőmerisztéma csak egy meghatározott ideig, a gümőprimordium kialakulásakor működik, így ezek a gümők gömb alakúak maradnak, és az indetermináltat, ahol az apikális merisztéma mindvégig aktív marad és a gümő hosszanti megnyúlását okozza. Mindkét gümőtípus esetében jellemző a szimbiotikus sejtek sorozatos endoreduplikációja és méretnövekedése. A determinált gümőkben a szimbioszómákat tartalmazó sejtek differenciálódása mindig azonos állapotban van, míg az indeterminált gümőkben, ahol a merisztéma állandóan termeli a differenciálódásba lépő sejteket, kialakul egy kor- és differenciálódási gradiens a gümő csúcsától a gümő aljáig, ami a gümők folyamatos hosszanti növekedését eredményezi (7. ábra).



7. ábra. A két fő gümőtípus.

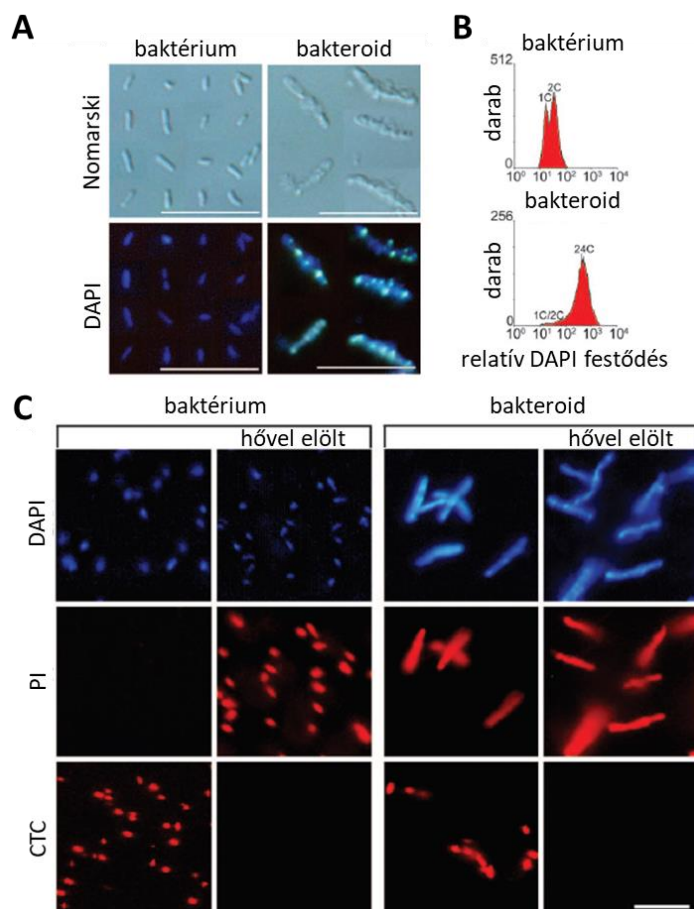
A. A determinált gümő sematikus és mikroszkópos szerkezete: azonos fejlődési stádiumban lévő hatalmas szimbiotikus sejtek, bennük bakteroidok ezreivel. **B.** Az indeterminált gümő sematikus és mikroszkópos szerkezete: a sejtek lépcsőzetes növekedése egy hosszanti metszeten látható, kiemelve egy nitrogénkötő sejtet. I: egyes zóna, II: kettes zóna, II-III: átmeneti zóna, III: nitrogénkötő zóna, IV: öregedési zóna. Kék szín: a metszetek toluidin kék festése. Eredeti ábra: Kondorosi és mtsai., 2013.

Az indeterminált gümő csúcsán lévő apikális merisztéma (egyes zóna: ZI) alatt elhelyezkedő fiatal sejtekbe kerülnek a szimbioszómák az infekciós fonálból, majd ezekben endoreduplikációs ciklusok révén sejtrétegenként ploidiaszint- és méretnövekedés következik be, egyre nagyobb számú szimbioszóma jelenlétével (kettes, infekciós zóna: ZII). A legfeltűnőbb változások a ZII alatti 2-3 sejtrétegben következnek be, ahol a baktériumok mérete drasztikusan megnő, és a növényi sejtek is nagyrészt elérik végső méretüket. Ezt a zónát átmeneti zónának vagy interzónának (IZ) nevezik, amelyre az amiloplasztok nagyszámú jelentéle is jellemző. Az IZ alatt a nitrogénkötő ZIII található a végső differenciálódási stádiumban. Az itt található bakteroidok képesek redukálni a légköri nitrogént ammóniává és azt átadni a növényi sejteknek (Xiao és mtsai., 2014). A zónára (determinált gümő esetében a teljes kifejlett gümőre) jellemző rózsaszín színt a leghemoglobin (Lb) adja, ami az oxigén megkötésével alkalmassá teszi a gümőt az oxigén jelenlétére érzékeny nitrogenáz enzimkomplex működésére. Az obligát aerob rhizobium légzési lánc a gümőben uralkodó

mikroaerob környezetben sem áll le, így az ehhez szükséges oxigén adagolása is az Lb feladata (Udvardi és Poole, 2013). A sejtek öregedésével jön létre a 4. zóna (ZIV), ahol beindul a bakteroidok lebomlása.

1.8. A bakteroid differenciáció

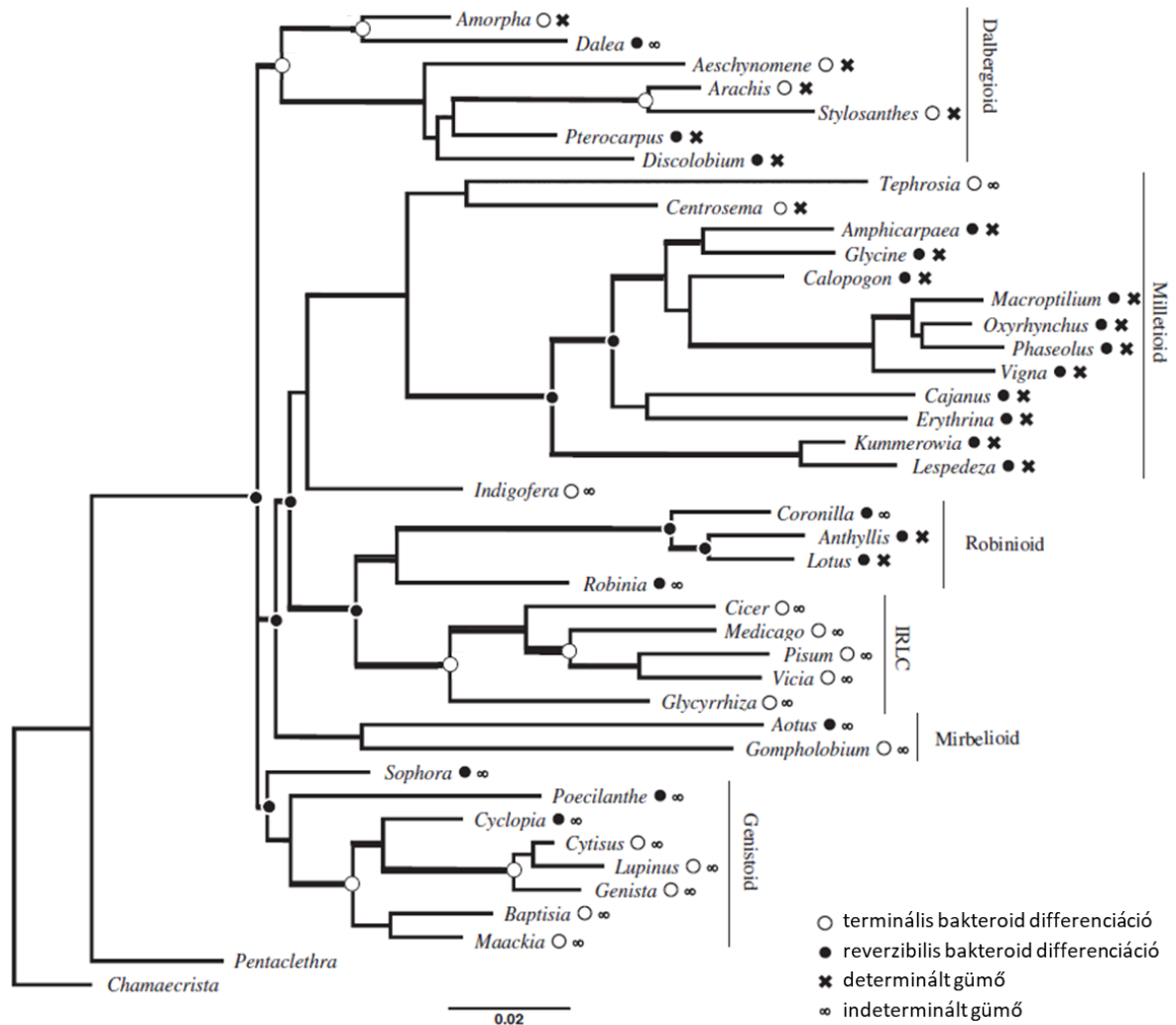
A nitrogénkötő bakteroidok mérete és formája eltérő lehet a különböző gazdanövényekben. Bizonyos növényekben, mint amilyen a *L. japonicus* vagy a szója (*Glycine max*), a baktériumok mérete, formája, DNS-tartalma megegyezik a szabadonélő baktériumokéval. Ezzel szemben más növényekben, mint például a *Medicago* fajokban és a borsóban, a bakteroidok jelentős mértékben megnyúlnak (méretük akár 5-10-szerese is lehet a szabadon élő baktériumoknak), akár Y alakúak is lehetnek, a genom-méretük az endoreduplikációs ciklusok révén megsokszorozódik, a membránjuk átjárhatósága növekedik és elveszítik osztódási képességüket, vagyis a differenciálódásuk visszafordíthatatlan, terminális (8. ábra).



8. ábra. *S. meliloti* 1021 baktérium sejtek terminális differenciációja *Medicago truncatula* gümőben.

A. Sm1021 szabadonélő (baktérium) és szimbiotikus (bakteroid) formája differenciál-interferencia kontraszt mikroszkópiával nézve (Nomarski) és DNS-kötő fluoreszcens DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) festékekkel megfestve. **B.** DAPI-val festett szabadonélő baktériumok és bakteroidok DNS-tartalma áramlási citométerrel mérve. **C.** Élő és hővel előlt (70°C, 10 perc) baktériumok és bakteroidok DAPI, propidium-jodid (PI) és CTC (5-ciano-2,3-di-(p-tolil)tetrazólium klorid) fluoreszcens festékekkel festve. A PI nem jut be az élő Sm1021 baktériumba, míg az élő bakteroidba igen a megváltozott membrán-áteresztő képessége miatt. A CTC légzés útján kerül a sejtekbe, így jelenléte mutatja, hogy a PI-festett bakteroidok élnek. **Méret: A, C: 10 µm.** (Mergaert és mtsai., 2006).

A membrán nagyobb átjárhatósága nagy valószínűséggel megkönnyíti a nitrogénkötő baktérium és a gazdanövény közti kommunikációt, a különböző molekulák átadását. A baktériumok sorsát és differenciálódási típusát a gazdanövény határozza meg (Mergaert és mtsai., 2006). A szimbióta átalakításának képessége a *Papilionoideae* nemzetségen belül több ágon alakult ki egymástól függetlenül, ami azt sugallja, hogy a terminális differenciáció indukálása valamilyen előnnyel jár a növény számára (9. ábra).



9. ábra. Bükkönyforma (*Papilionoideae*) nemzetségek filogenetikai fája a *matK*, *rbcL*, részleges *trnL* és 5.8S rRNS génszekvenciák alapján.

A terminális bakteroid differenciáció legalább ötször jelent meg a *Papilionoideae* nemzetségben. A bükkönyformák hat nagy kládja: Dalbergioidok, Millettioidok, Robinioidok, IRLC, Mirbelioidok, Genistoidok. Kulcsoport: lepényfaformák (*Chamaecrista*, *Pentaclethra*). Az elágazásoknál található jelek az ősi bakteroid formát jelölik (Oono és mtsai., 2010 ábrája, módosítva az újabb megfigyelések alapján).

A terminális differenciáció azonban nem minden növényben szükséges a nitrogénkötéshez, hisz nitrogénkötésre a nem differenciálódó, reverzibilis sorsú rhizobiumok is képesek, amelyek mérete, DNS-tartalma megegyezik a szabadon élő baktériumokéval, megőrzik osztódó-képességüket, és szimbiózisból képesek visszatérni a szabadon élő formává. Ez történik a másik gyakori pillangósvirágú modellnövény, a *L. japonicus* vagy a szója szimbiótái esetében. Bár nehéz összehasonlítani a különböző növényekben a szimbiotikus nitrogénkötés hatékonyságát az eltérő baktérium-partnerek és a növény morfológiai adottságai miatt, egyes becslések szerint a terminálisan átalakult bakteroidok hatékonyabban kötik meg a nitrogént, illetve nem képesek felhasználni a növény által nyújtott szénforrást anélkül, hogy ne viszonyoznák azt az atmoszferikus nitrogén átalakításából származó ammóniával, illetve aminosavakkal (Oono és Denison, 2010). Mivel a szimbióta baktériumok sorsa a gazdanövénytől függ, és a családon belül több ágon is kialakult a terminális differenciáció, ez ugyancsak alátámasztja, hogy a növénynek ebből haszna származik. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy ha egy baktérium képes működőképes gümőt létrehozni két olyan gazdanövényen, melyek közül az egyik gümőjében reverzibilisen, a másikban terminálisan differenciálódik, a nitrogénáz enzimkomplex aktivitása jóval magasabb a terminálisan differenciálódott bakteroidok esetében (Oono és Denison, 2010; Chen és mtsai., 2023).

Az IRLC fajokban a nitrogénkötő bakteroidok terminálisan differenciálódnak, bár ennek mértéke eltérő a különböző fajokban: enyhén puffadtól (például a *Glycyrrhiza uralensis* esetében) a megnyúlt-elágazó fenotípusig, ahol a bakteroid mérete 1-1,5 μm -ról 6-8 μm -re növekszik, mint például az *M. truncatula* vagy a borsó esetében (Montiel és mtsai., 2017). A terminális bakteroid differenciáció egy másik, ritkább eseténél a bakteroid felpuffad és gömb alakú lesz, úgynevezett szférikus formát vesz fel, ami egymástól függetlenül alakult ki az IRLC *Ononis spinosa*-nál (Montiel és mtsai., 2017) és egyes *Aeschynomene* fajoknál (Czernic és mtsai., 2015; Oono és mtsai., 2010).

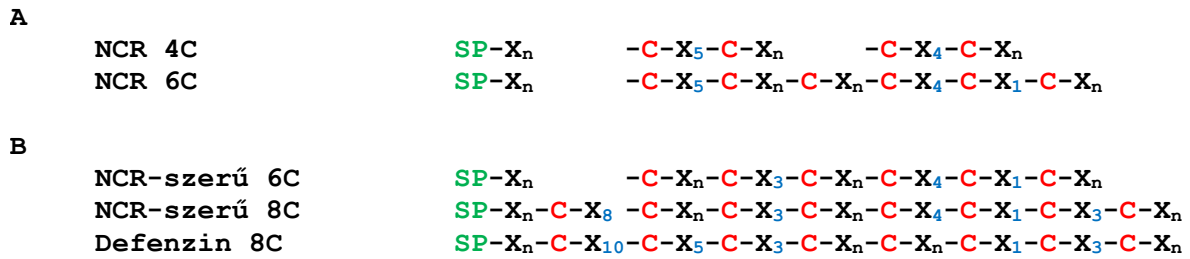
1.9. A bakteroid differenciációt kiváltó növényi faktorok

A növényi faktorok felfedezéséhez a *M. truncatula* és a *L. japonicus* gümőtranszkriptom összehasonlítása vezetett, ami több száz olyan kis gén expresszióját mutatta ki *M. truncatula* gümőben, ami hiányzott a *L. japonicus* gümőkéből, ahol a bakteroidok reverzibilis differenciáción mennek át. Ezek valamennyien szekretált peptideket vagy kis fehérjéket kódolnak, melyek homológjai csak és kizárólag IRLC növényekben találhatók meg. A transzkriptom analízis

vezetett a 700 tagot magába foglaló NCR (nodule-specific cysteine-rich peptide) (Mergaert és mtsai., 2003), és a 28 tagú GRP (nodule-specific glycine-rich protein) (Kevei és mtsai., 2002) géncsaládok felfedezéséhez. Ezek a peptidek a szimbiotikus sejtekben termelődnek, és a szimbioszómákhoz a szekréciós útvonalon keresztül jutnak el. A peptidekről az endoplazmatikus retikulumban (ER) a szignál peptidáz komplex (SPC) vágja le a szignál peptidet (SP), és az éretté vált, aktív peptidek a Golgi-készüléken keresztül transz-Golgi vezikulumokban érkeznek a szimbioszómához, majd a két membrán fúziója után kerülnek kapcsolatba a bakteroiddal. A peptidek szerepét a bakteroid differenciálódásban a *dnf1* (defective in nitrogen-fixation 1, nitrogénkötésre képtelen-mutáns 1) mutáns vizsgálatával sikerült bizonyítani, ahol a SPC komplex egy gümőspecifikus elemének hiányában a SP levágása nem történt meg. Ekkor a teljes hosszúságú peptidek az ER-ben maradtak és így a bakteroidok differenciálódása nem következett be (Van de Velde és mtsai., 2010). A bakteroidok a terminális differenciáció jeleit mutatták akkor is, amikor az NCR peptideket *L. japonicus* gümőben termeltették.

1.9.1. A gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptidek (NCR-ek)

Az NCR-eket, mint gümőspecifikus peptidcsaládot, 2003-ban a *M. truncatula*-ban fedezték fel (Mergaert és mtsai. 2003). Az NCR peptidek kizárólag a gümőben és azon belül is kizárólag a szimbiotikus sejtekben található meg (az NCR122 kivételével) (Guefrachi és mtsai., 2014; Maunoury és mtsai., 2010). A *M. truncatula* nyolc kromoszómáján elszórva több mint 700 NCR gén található, melyek általában két, ritkábban három exonból állnak (Maróti és Kondorosi, 2014). Az első exon kódolja a meglehetősen jól konzervált szignál peptidet (SP), míg a második a sokkal változatosabb, általában 35-50 aminosav hosszúságú érett peptidet, ami azonban négy vagy hat cisztein aminosavat tartalmaz konzervált pozíciókban (Alunni és mtsai., 2007) (10A. ábra).



10. ábra. Az NCR és NCR-szerű peptidek szerkezeti jellemzői. A: Az IRLC NCR-ek sematikus ábrázolása. **B:** A Dalbergioid növényekben kifejeződő NCR-szerű (NCR-like, NCRL) peptidek és a növényi defenzinek sematikus ábrázolása. SP: szignál peptid. Piros C: konzervált cisztein. X: bármely aminosav. n: tetszőleges számú aminosav.

Ezek a konzervált ciszteinek nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a szimbiózisban, már egyetlen cisztein mutációja működésképtelenné tette az NCR169 peptidet (Horváth és mtsai., 2015). A konzervált ciszteinek között létrejövő diszulfid-hidak feltételezhetően fontos strukturális és funkcionális elemei az NCR peptideknek. Ezek a kovalens kötések az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenjének oxidáló közegében jönnek létre, ahol a protein diszulfid izomeráz (PDI) és az ER oxidoreduktin 1 oxidálja a ciszteinek szabad thiol csoportját (SH) diszulfid-híddá (S-S). A diszulfid-híd stabilizálja a fehérjéket, például ellenállóbbá teszi őket a proteolízissel szemben, valamint befolyásolja a fehérje szerkezetét. A *M. truncatula* szimbiotikus sejtjei egy gümős-specifikus thioredoxint (Trx s1) termelnek, ami a thioredoxinokra nem jellemző SP-je révén a bakteroid citoszoljába lokalizálódik, ahol képes redukálni az NCR-eket, melyek így, a diszulfid-hidak hiányában még aktívabbakká válnak (Ribeiro és mtsai., 2017).

Az NCR-ek az ER-ből, majd a Golgi-készülékből a szimbioszómákba jutnak (Van de Velde és mtsai. 2010; Horváth és mtsai. 2015), ahol kapcsolatba léphetnek a bakteroidok membránjával és bejuthatnak a belsejükbe. A baktérium belső membránjában található BacA ABC-transzporter segítségével juthatnak be egyes NCR-ek a bakteroidba és ez a transzportfehérje nélkülözhetetlen a szimbiózishoz ott, ahol a növényi partner NCR-eket vagy NCR-szerű peptideket termel (diCenzo és mtsai., 2017; Guefrachi és mtsai., 2015a, 2015b). Bakteroidok proteomikai vizsgálatával 74 NCR peptidet (köztük a sokat tanulmányozott NCR001-et és NCR169-et) azonosítottak izolált bakteroidokból (Dürgő és mtsai., 2015). Érdekes módon a bakteroidokban a késői kifejeződésű NCR-ek mellett a koraiak is jelen voltak, ami alapján úgy tűnik, a bakteroidok proteolitikus enzimek nem bontották le az NCR-eket. Több NCR estében poszt-transzlációs módosításokat is kimutattak, így például foszforilációt

(többek között az NCR001 esetében) vagy acetilációt (NCR169) (Marx és mtsai., 2016), de az nem ismert, hogy melyik partner hajtja végre ezeket a változtatásokat.

Az *NCR* gének, akárcsak a többi gümőspezifikus gén, két fejlődési hullámban fejeződnek ki: lehetnek korai gének, amelyek a fejlődő 4-10 napos gümőben aktiválódnak, és lehetnek késői gének, amelyek a 13-29 napos gümőben expresszálódnak (He és mtsai., 2009; Maunoury és mtsai., 2010; Guefrachi és mtsai., 2014). Az *NCR*-ek időbeli kifejeződése összhangban van a térbeli kifejeződésükkel és a kettő nem választható szét egymástól: a korai *NCR*-ek a fiatal gümőzónákban (ZII, IZ) működnek, melyek folyamatosan újratermelődnek a gümő növekedésével együtt és így végig jelen vannak a gümőben, míg a késői *NCR*-ek az érett gümőben jelennek meg a tizedik nap után, amikor kialakul a terminálisan differenciált bakteroidokat tartalmazó nitrogénkötő zóna (ZIII), ami onnantól kezdve szintén végig jelen van a gümőben. Az *NCR* transzkriptek 55%-a az IZ-ben található meg (Roux és mtsai., 2014 adatai alapján).

1.9.2. Az *NCR*-ek kialakulása

Az *NCR* géneknek nincsen homológjuk az IRLC kládon kívül (Mergaert, 2018). Az IRLC-én belül a legősibb csoportba tartozó *Glycyrrhiza uralensis* 7 *NCR* génnel rendelkezik (Montiel és mtsai., 2017), és az eddig megvizsgált összes IRLC faj kódol *NCR*-eket (Frühling és mtsai., 2000; Mergaert és mtsai., 2006; Istvánék és mtsai., 2014; Montiel és mtsai., 2016, 2017; Huang és mtsai., 2022), míg az IRLC testvércsoportja, a Robinoid klád fajtái nem. A Dalbergioid klád eddig vizsgált fajaiban (*Aeschynomene* és *Arachis* fajok) az *NCR*-ekhez hasonló felépítésű és szintén gümőspezifikus *NCR*-szerű peptidek találhatóak, melyek feltehetően konvergens evolúció eredményei (Czernic és mtsai., 2015; Bertoli és mtsai., 2016; Raul és mtsai., 2022). Az *NCR*-ek és az *NCR*-szerű peptidek felépítésükben a minden eukariótában megtalálható defenzinre hasonlítanak, feltételezhetően azokból alakultak ki (10B. ábra), azonban a defenzinek nyolc vagy tíz ciszteint tartalmaznak, és konzerválódott térszerkezettel rendelkeznek a négy vagy öt diszulfid híd révén. Az *NCR* gének gyakran klaszterekbe rendeződve találhatóak meg a *M. truncatula* kromoszómáin. A gének megsokszorozódásáért és elterjedéséért nagyban felelősek lehetnek a közelükben előforduló transzpozonok és retroelemek (Sátgé és mtsai., 2016). Az *NCR* peptidek aminosav összetétele rendkívül variábilis, szekvenciahasonlóság leginkább csak a recens duplikációknál figyelhető meg (például a *M. truncatula* NCR178 és NCR211 között (Kim és mtsai., 2015), vagy azon IRLC

fajok esetében, melyek kevés NCR-rel rendelkeznek (*G. uralensis*, *C. arietinum*, *Oxytropis lambertii*) (Montiel és mtsai., 2017). A szimbiotikus baktériumok átalakulásának mértéke nagyban összefügg az adott fajban található NCR-ek, illetve NCR-szerű peptidek számával, továbbá a peptidek fizikokémiai tulajdonságaival, például a megnyúlt, elágazó bakteroid morfológia a kationos peptidek megjelenésével párosul (Czernic és mtsai., 2015; Montiel és mtsai., 2017, 2016).

1.9.3. Az NCR peptidek fizikokémiai tulajdonsága és ismert funkcióik

A változatos aminosav-összetételük miatt az érett *M. truncatula* NCR-ek izoelektromos pontja (pI) 3,5-11,25 között változik: 35%-uk anionos (pI: 6 alatt), 23%-uk neutrális (pI: 6-8), míg 42%-uk kationos (pI: 8 fölött). A ZII-ben előforduló NCR-ek, nagyrészt anionosak vagy neutrálisak, míg az IZ-ben és ZIII-ban egyre nagyobb számban és arányban fejeződnek ki a kationos NCR-ek. A szimbiotikus sejtekben a baktériumfertőzéstől a nitrogénkötés létrejöttéig az NCR-ek különböző csoportjai fejeződnek ki, néhány tucat a kezdeti lépésekben, míg a legtöbb, néhány száz az IZ-ben és szintén sok a ZIII-ban. Az anionos, neutrális és kationos peptidek együttesen irányítják a bakteroid differenciáció különböző lépéseit. Több kationos, +2 és +9 közötti nettó töltésű (net charge, NC) peptidről beigazolódott, hogy képesek kapcsolatba lépni a negatív töltésű bakteriális membránnal, és bejutni a baktériumok citoszoljába *in vitro*. A neutrális és anionos peptidek nem léptek kapcsolatba a membránnal, ennek ellenére kimutathatók voltak a baktériumok citoszoljában (Dürgő és mtsai., 2015). Ennek a mechanizmusa még nem ismert, de lehetséges, hogy a kationos peptidek segítik ezekben a peptideknek a bejutását a bakteroidokba. Affinitás kromatográfiás kölcsönhatási kísérletekben kimutatták, hogy az NCR-ek kötődnek egymáshoz. A 700 MtNCR peptid közül kettő nélkülözhetetlen a nitrogénkötő gümő fejlődéséhez. Az anionos NCR211 funkciója ismeretlen (Kim és mtsai., 2015), míg az NCR169 hiányában a bakteroidok nem érik el a rájuk jellemző végső méretet, és nem termelődnek további NCR-ek, amik feltehetően az utolsó differenciálódási lépésekhez szükségesek (Horváth és mtsai., 2015). A bakteroid differenciáció egyik alapvető lépése a sejtosztódási képesség elvesztése. Ebben a legnagyobb szerepe a kationos, IZ-ban termelődő peptideknek lehet. Míg ezeknek a peptideknek *in vitro* antimikrobiális aktivitása van, a szimbiózisban a rhizobium baktériumok megőrzik életképességüket, feltehetően a nem kationos peptidek védőhatása révén.

1.9.4. Az NCR-ek *in vitro* antimikrobiális hatása

Szintetikus NCR-ek hatását vizsgálva a szimbiotikus baktérium *S. meliloti* partneren kiderült, hogy a kationos peptidek membránkárosító hatásúak, és *in vitro* el tudják pusztítani a baktériumokat (Van de Velde és mtsai., 2010). Általában a kationos NCR-ek, elsősorban pI=9 felett, antimikrobiális hatással rendelkeznek, de az eddig ismert, főként a bakteriális membrán negatív töltését célzó kationos antimikrobiális peptidekkel (AMP) szemben, ezek egyszerre több célpontot is támadnak a baktériumokban, így ellenük jóval nehezebben alakul ki rezisztencia (Lima és mtsai., 2020b). A három legjobban tanulmányozott NCR, az NCR169, az NCR247 és az NCR335, valamint származékaik, gyorsan és hatékonyan pusztítottak el számos növényi, állati és emberi patogént (Balogh és mtsai., 2014; Farkas és mtsai., 2017; Mikuláss és mtsai., 2016; Nagy és mtsai., 2015; Tiricz és mtsai., 2013), köztük az antibiotikumokra nem reagáló, ESKAPE baktériumokat (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), melyeknek egyes multirezisztens törzsei hajlamosak túlélni akár a legmodernebb antibiotikum-terápiákat (Jenei és mtsai., 2020). A baktériumokon kívül hatékonyak az oppurtunista patogén *Candida albicans*-sal és egyéb *Candida*-fajokkal szemben is (Ördögh és mtsai., 2014; Szerencsés és mtsai., 2021).

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során célul tűztük ki az NCR és NCR-szerű peptidcsaládok evolúciójának, strukturális jellemzőinek és szabályozásuknak feltárását.
2. Elemeztük az NCR szignál peptideket (NCR SP), konzerváltságukat, és ennek jelentőségét.
3. Vizsgáltuk a gümőspezifikus szignál peptid peptidáz, a nodSPP szerepét a szimbiózisban és kapcsolatát az NCR SP-ekkel.
4. Vizsgáltuk az NCR-ek antimikrobiális hatását különböző humán kórokozókkal szemben. Vajon a kationosság a legfőbb meghatározója az NCR peptidek antimikrobiális tulajdonságának?

A témában közölt cikkeim:

- **Rui M. Lima**, Salome Kylarová, Peter Mergaert, Éva Kondorosi: Unexplored arsenals of legume peptides with potential for their applications in medicine and agriculture (Frontiers in Microbiology, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01307)
A review megírása során nagyban támaszkodtam a csoport által írt cikkekre, melyek egy részében társszerző vagyok.
- Sándor Jenei, Hilda Tiricz, János Szolomájer, Edit Tímár, Éva Klement, Mohamad Anas Al Bouni, **Rui M. Lima**, Diána Kata, Mária Harmati, Krisztina Buzás, Imre Földesi, Gábor K. Tóth, Gabriella Endre és Éva Kondorosi: Potent chimeric antimicrobial derivatives of the *Medicago truncatula* NCR247 symbiotic peptide (Frontiers in Microbiology, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00270)
A szintetikus NCR247 peptiddel és NCR247 származékokkal végzett antimikrobiális tesztek kivitelezésében és a cikk megírásában vettem részt.
- Attila Farkas, Gergely Maróti, Hajnalka Dürgő, Zoltán Györgypál, **Rui M. Lima**, Katalin F. Medzihradzky, Attila Kereszt, Peter Mergaert, Éva Kondorosi: *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, doi: 10.1073/pnas.1404169111)
Az NCR247 promóter aktivitását vizsgáltam *Medicago truncatula* gümőben.
- Hilda Tiricz, Attila Szűcs, Attila Farkas, Bernadett Pap, **Rui M. Lima**, Gergely Maróti, Éva Kondorosi, Attila Kereszt: Transcriptome analysis of bacteria challenged with antimicrobial peptides of plant origin (Applied and Environmental Microbiology, 2013, doi: 10.1128/AEM.01791-13)

A szintetikus NCR247-el és NCR335-al kezelt szabadonélő Sm1021-en végzett transzkriptom-analízist elemeztem.

- Senlei Zhang, Ting Wang, **Rui M. Lima**, Aladár Pettkó-Szandtner, Attila Kereszt, J. Allan Downie, Éva Kondorosi: Widely conserved AHL transcription factors are essential for NCR gene expression and nodule development in *Medicago* (Nature Plants, 2022: doi: 10.1038/s41477-022-01326-4)
Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) és konfokális mikroszkópos képeket készítettem.
- **Rui M. Lima**, Balaji Baburao Rathod, Hilda Tiricz, Dian H. O. Howan, Mohamad Anas Al Bouni, Sándor Jenei, Edit Tímár, Gabriella Endre, Gábor K. Tóth, Éva Kondorosi: Legume Plant Peptides as Sources of Novel Antimicrobial Molecules Against Human Pathogens (Frontiers in Molecular Biosciences, 2022: doi: 10.3389/fmolb.2022.870460)
Az antimikrobiális tesztek egy része, a mikroszkópos képek (konfokális, SEM) nagy része és a DNS-kötő vizsgálat mellett én csináltam a grafikonokat, valamint részt vettem a cikk írásában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Molekuláris biológiai módszerek

3.1.1. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)

A két SPP paralóg illetve további gének expressziós szintjének meghatározásához RNS-t izoláltunk *Quick-RNA Plant Miniprep* kittel (Zymo Research), két *M. truncatula* ökotípus, A17 és R108, különböző szerveiből: gümőből, gyökérből, szárból és levélből. A DNáz (Thermo Scientific) kezelt RNS-ből cDNS-t *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*-tel (Applied Biosystems) szintetizáltunk, a RT-qPCR reakciót *PowerUp SYBR Green Master Mix*-tel (Applied Biosystems) végeztük el. Belső kontrollnak a 40S riboszómális S19-szerű fehérje mRNS-ét (Medtr3g013640) használtuk. A RT-qPCR-hez használt primerek szekvenciája az 1. függelékben található meg.

3.1.2. Az RNS-interferencia vektorok előállítása

A csendesíteni kívánt gének 200-300 bp hosszú szekvenciáját amplifikáltunk fel A17 cDNS-ről olyan primerpárral, melynek tagjai tartalmazták az adaptor szakaszokat (attB1 és attB2) a BP rekombinációhoz (*Gateway BP Clonase II Enzyme Mix*, Thermo Scientific) a pDONR207 vagy pDONR221 donor vektorba (Invitrogen). Az ezt követő LR rekombináció (*Gateway LR Clonase II Enzyme Mix*, Thermo Scientific) a pUB-GWS-GFP destination vektorba (Maekawa és mtsai., 2008) történt, illetve a módosított pKGW-RR és pCAMBIA3301 vektorokba, melyek tartalmazták az RNS-interferencia kazettát a pUB-GWS-GFP vektorból. Az RNS-interferencia egy ősi szabályozó, illetve védekező mechanizmus minden eukarióta sejtben, ami a mikroRNS-ekkel komplementer RNS és egyéb kettősszálú RNS lebontásáért felelős, mely molekula-típus gyakran RNS-vírusok replikációs intermediere. Az RNS-interferencia doboz két példányban tartalmazza a csendesíteni kívánt génszakaszt, melyek közül a második az elsőhöz képest fordított orientációban épült be, így a vektor a specifikus szakaszt kettősszálú formában fejezte ki a *L. japonicus ubiquitin 10* (Ljubq10) promóterrel. A *gümőspecifikus szignál peptid peptidáz* (*nodSPP*) esetében egy 285 bp hosszú kódoló génszakaszt használtunk csendesítéshez (2. függelék). A PCR-hez használt primerek szekvenciái az 1. függelékben található meg.

3.1.3. Az *NCR169* promótert tartalmazó vektorok előállítása

Az *NCR169* promóter *M. truncatula* és szójagümőben történő vizsgálatához a promóter 1181 bp és 436 bp hosszú szakaszát illesztettük pCAMBIA3301 vektorba, a GUS riporter gén elé (upstream), a CaMV35S promóter helyére. Az *NCR169* peptid szójagümőben történő termeltetéséhez a 1181 bp hosszú promótert és az *NCR169* gén mindkét exonját és egyetlen intronját amplifikáltuk fel, majd BP reakcióval (Gateway BP Clonase II Enzyme Mix, Thermo Scientific) rekombináltuk a pENTR2B (Thermo Fisher Scientific) vektorba, majd innen LR reakcióval (Gateway LR Clonase II Enzyme Mix, Thermo Scientific) a pKGW-RR vektorba.

3.1.4. Transzkriptom-szekvenálás

Vermikulitban növesztett vad típusú R108 (kontroll) és R108-hátterű nodSPP RNSi növényeket fertőztünk kompatibilis *Sinorhizobium meliloti* Rm41 baktériummal, majd 15 napos (15 dpi) gümőkéből 3-3 biológiai párhuzamos mintát gyűjtöttünk folyékony nitrogénbe. Növényi RNS-t a *Quick*-RNA Plant Miniprep kittel (Zymo Research) izoláltunk. Az RNS minták mennyiségét és minőségét Agilent 2200 TapeStation elektroforézis-rendszerrel (Agilent Technologies) ellenőriztük. Az RNS minták szekvenálása Solid 4 (Applied Biosystems) újgenerációs szekvenálási platformmal történt. Mind a mintaelőkészítést, mind a szekvenálást a gyártó által javasolt protokoll alapján végeztük el.

3.2. Növényi munka

3.2.1. Magsterilizálás, csíráztatás, fertőzés

A hüvelyből kibontott *M. truncatula* vagy szója magokat 8 percig 96%-os kénsavban (H_2SO_4) inkubáltuk, ami pórusokat nyit a maghéjon, majd legalább háromszor átöblögettük jéghideg desztillált vízben, elkerülve, hogy az exoterm reakció megégesse a magokat. Ezután 3 percig 0,1% higany(II)-kloridban ($HgCl_2$) sterilizáltuk a magokat, majd ötször mostuk desztillált vízben. A sterilizált magokat 1% agart tartalmazó desztillált vizes lemezen $4^\circ C$ -on, sötétben inkubáltuk 1-3 éjszakán át, majd szobahőmérsékleten és sötétben további 1 éjszakán át. A növényeket ezután Buffered Nod Medium (BNM, összetevők 1 literben, pH 6.5: $CaSO_4 \times$

2H₂O: 344 mg, MES x H₂O: 390 mg, NaFe-EDTA: 18,35 mg, ZnSO₄ x 7H₂O: 4,6 mg, H₃BO₃: 3,1 mg, MnSO₄ x H₂O: 8,45 mg, Na₂MoO₄ x 2H₂O: 250 mg, CuSO₄: 16 mg, CoCl₂ x 6H₂O: 25 mg, MgSO₄ x 7H₂O: 122 mg, KH₂PO₄: 68 mg, Kalys agar: 11,4 g) lemezre tettük vagy nitrogén- és tápanyagmentes zeolitba, vermikulitba, esetleg magoztatás céljából földbe.

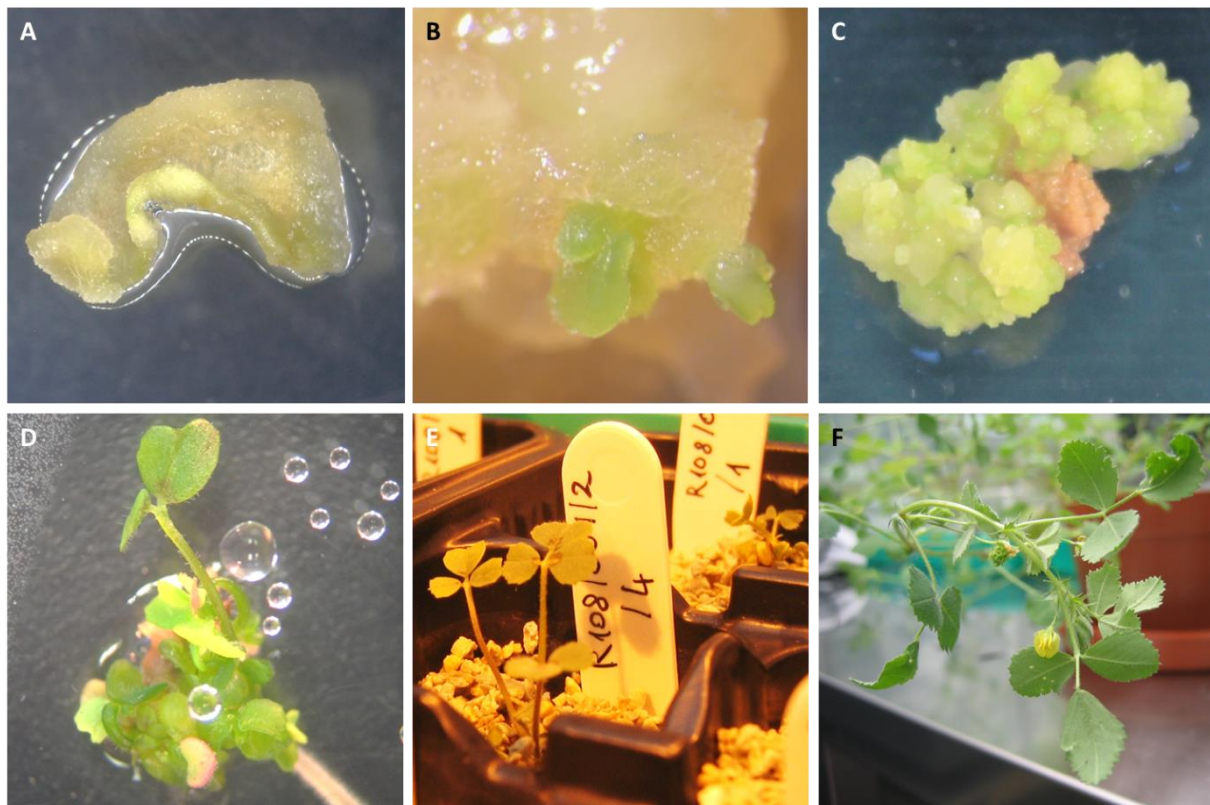
A rhizobiumokat TA táptalajon (összetevők 1 literben: 10 g tripton, 1 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 15 g agar) növesztettük 30°C-on. Két nap után a táptalajról felkapart rhizobiumokat nitrogénszegény Fahreus tápoldatban (0,7 mM KH₂PO₄, 0,8 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM MgSO₄, 0,9 mM CaCl₂, 20 µM vas-citrát, pH 7.4, autokláv után: 1,6 µM H₃BO₃, 0,6 µM CuSO₄, 0,5 µM NaMoO₄, 0,6 µM ZnSO₄, 0,6 µM MnSO₄) szuszpendáltuk fel, majd az oldatot a növények gyökerére öntöttük.

3.2.2. Tranziens transzgenikus vonalak előállítása

A kicsírázott steril magok gyököcskéjének a végét levágtuk, körülbelül fél cm-t hagyva belőle. Ezután a sebési pontot a transzformálni kívánt plazmidot (pUB-GWS-GFP, módosított pKGW-RR, pCAMBIA3301) hordozó, LB táptalajon (összetevők 1 literben, pH 7.5: 10 g tripton, 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 15 g agar) növe Agrobacterium rhizogenes Arqua1 pázsitba mártottuk, majd BNM lemezre tettük legalább két hétre. Vermikulitba vagy zeolitba ültetés előtt a GFP transzformációs markert ki nem fejező gyökereket levágtuk, majd a megfelelő rhizobium törzssel gümöztettük.

3.2.3. Stabil transzgenikus vonalak előállítása

Az RNSi vektorokat (módosított pCAMBIA3301) R108 szövetkultúrába *A. tumefaciens* EHA-105 törzssel, míg 2HA szövetkultúrába *A. tumefaciens* Ag11 törzssel vittük be (Hoffmann és mtsai., 1997; Crane és mtsai., 2006; Cosson és mtsai., 2015) (11. ábra).



11. ábra. *Medicago truncatula* stabil transzformáns növények előállításának lépései. **A.** A baktériumszuszpenzióval inokulált levéldarab elkezd kalluszá alakulni (kalluszosodó). **B.** Embriók (zöld) nőnek a kalluszon. **C.** A kalluszt teljesen beborítják az embriók. **D.** Az embriókból kialakuló levélszerű képződmények közül kalluszonként egy-három valódi növényé fejlődik. **E.** Gyökereztetéshez kiültetett növény. **F.** Teljesen kifejlett, virágzó, terméseket hozó stabil transzformáns növény (T0 nemzedék).

A sikeres transzformánsokat foszfinotricinnel (PPT) szelektáltuk, míg a transzgén jelenlétét PCR-el validáltuk *Ljubq10* promóter-specifikus primerekkel (1. függelék), mely promóter a nodSPP kódoló szekvenciájával homológ kettősszálú RNS kifejezéséért felelős, és melynek szekvenciája nem található meg *M. truncatula*-ban. Két transzformáns vonalat vizsgáltunk tovább, melyekben a nodSPP mRNS-szintje 2-10%-a a vad típusénak, amit RT-qPCR-el határoztunk meg a T1 növények gümőiben. A további kísérletekhez T2-T5 generációs növényeket használtunk.

A nodSPP-n kívül nyolc *NCR* (*NCR001*, *NCR025*, *NCR084*, *NCR164*, *NCR209*, *NCR235*, *NCR247*, *NCR335*) és öt *GRP* (*GRP1L*, *GRP2A*, *GRP3A*, *GRP3C*, *GRP4*) gén csendesítéséhez állítottunk elő összesen ötvenöt stabil transzgenikus vonalat, melyeket még nem vizsgáltunk.

3.3. Mikroszkópia

3.3.1. Mintaelőkészítés mikroszkópiához

Bakteroid-izolálás során a folyékony nitrogénben vagy PBS pufferben előrölt gümöket felvettük PBS-ben, és 10 µm pórusátmérőjű CellTrics szűrőn (Sysmex) áteresztve nyertük ki a bakteroidokat.

Jó minőségű, nagy felbontású gümömetszet készítéséhez a gümöket technovit műgyantába ágyasztuk a gyártó utasításai szerint (Technovit 7100), majd mikrotómmal 5-7 µm vastag szeleteket vágunk.

Kevésbé jó minőségű, de még élő gümömetszet készítéséhez a gümöket 5% low-melting agarózba ágyasztuk, majd vibrotómmal 25-75 µm vastag szeleteket vágunk. Az ezen a módon készített gümömetszetek alkalmasak a pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatokhoz is.

A szabadon élő baktérium és bakteroid mintákat, illetve a gümömetszeteket 50 µg/ml propidium-jodiddal (PI) és/vagy 50 µg/ml SYTO 9 festékekkel festettük meg, melyek DNS-interkaláló képességük révén a DNS-hez kötődnek, de míg utóbbi áthatol az ép bakteriális membránokon is, addig a PI csak az elpusztult baktériumok vagy az átalakult bakteroidok membránján jut keresztül.

A SEM-hez a legalább egy órán át (egész gümő esetében javasolt egy teljes éjszakán át) fixált mintát (2,5% glutáraldehid PBS-ben vagy 50 mM nátrium-kakodilát pufferben) dehidratáltuk (1-1 óra 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% etanol, ez utóbbi még legalább kétszer cserélve a víz hatékonyabb eltávolításának céljából), majd a kritikus-pont szárítás (K850: Quorum Technologies Ltd) után 10-15 nm vastag arannyal vontuk be.

3.3.2. Sztereo mikroszkópia

Olympus SZX12 sztereo mikroszkópot használtunk 0.5x és 1x objektívvel. A fotókat Olympus Camedia C7070 digitális kamerával csináltuk, DScaler szoftvert (4.1.15 verzió, www.dscaler.org) használva.

3.3.3. Konfokális mikroszkópia

A konfokális lézer scanning mikroszkópiához Olympus Fluoview FV1000 mikroszkópot (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany) és Leica TCS SP5 mikroszkópot (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) használtunk.

3.3.4. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A SEM-hez JEOL JSM-7100F/LV korszerű pásztázó elektronmikroszkópot használtunk, ami termikusan segített téremisszió (T-FEG) alkalmazásával még magasabb felbontást eredményez és lehetővé tette a magas és alacsony vákuumban való munkát is.

3.3.5. Áramlási citometria (flow cytometry)

Az izolált bakteroidok DNS-ét SYTO 13-mal festettük, majd méretüket és mennyiségüket Moflo Astrio áramlási citométerrel (Beckman Coulter) mértük, a kapott adatokat Summit v6.1 szoftverrel (Beckman Coulter) elemeztük.

3.4. Biokémiai módszerek

3.4.1. GUS-festés

A mintákat jéghideg 90%-os acetonnal fixáltuk 1 órán át, majd egész éjszakán át inkubáltuk 37°C-on az X-Gluc festőoldatban (50 mM foszfát puffer (pH 7.2), 500 μ M $K_3Fe(CN)_6$ (kálium-ferricianid), 500 μ M $K_4Fe(CN)_6$ (kálium ferro-cianid), 2 mM X-Gluc (Thermo Fisher Scientific)).

3.4.2. ER membrán-izolálás

Az ER membrán-tisztítást William J. Simon és társai a 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation, volume 2 (Posch, 2008) című könyvben lévő protokollja alapján végeztük el, 4°C-on végezve minden centrifugálást.

A folyékony nitrogénben előrölt növényi mintát felvettük ugyanakkora térfogatú homogenizáló pufferben (500 mM szukróz, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol (DTT), 100 µM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)), majd 15 percig centrifugáltuk 1000 g-vel. A felülúszót óvatosan az előre elkészített szukróz grádiens tetejére mértük, ahol az alsó fázist 6,5 ml 30% szukróz alkotta, míg a felső fázist 3,5 ml 20% szukróz, mindkettő 1 mM EDTA-val és 100 µM PMSF-el. Ezt 2 óra centrifugálás követte 100000 g-vel (24200 rpm SW41 rotorral). Ezután a két fázis határán lévő opálos színű réteget ugyanakkora mennyiségű (~2 ml) 60%-os szukrózzal (+1 mM EDTA, 100 µM PMSF) kevertük el és erre rétegeztük az újabb grádiens: 3 ml 40%, 3 ml 30% és 2 ml 20% szukrózt (+1 mM EDTA, 100 µM PMSF), amit 22 óra centrifugálás követett 250000 g-vel (38200 rpm SW41 rotorral). A nagy tisztaságú ER-membrán frakció itt is a 20 és 30%-os szukróz határán volt található, amit ezután kiegészítettünk hideg desztillált vízzel 4 ml-re, ami a centrifugacső teljes térfogata, és centrifugáltuk 45 percig 250000 g-n (43000 rpm SW60 Ti rotorral). A pelletet ezután felvettük 100 µl pufferben (50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,25% n-Dodecyl β-D maltoside (DDM), 1% (v/v) proteáz inhibitor koktél (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche).

Mivel csíra nagy mennyiségben áll rendelkezésünkre, ráadásul az éppen csírázó mag nagyon sok ER-t tartalmaz, ezért elsősorban ebből a forrásból nyertük ki az ER membránt. 1 g száraz tömegű mag csírázás után 3 g-ra dagadt és ebből 100 µg ER membránfehérjét tisztítottunk, tehát a kiindulási tömeg egy tízezredének megfelelő fehérjét nyertünk ki. 1 g érett R108 gümőből 350 µg ER membránfehérjét sikerült izolálnunk.

A kinyert ER membránt a benne található calnexin transzmembrán fehérjére specifikus elsődleges (CNX1/2: AS12 2365, Agrisera) és nyúl IgG-specifikus másodlagos ellenanyaggal végzett Western blot analízissel ellenőriztük.

A tisztított ER-membrán 4°C-on legalább két héten át megőrizte az általunk vizsgált aktivitását.

3.4.3. Szimbioszóma membrán-izolálás

A szimbioszóma izolálásához Catalano és munkatársai (Catalano és mtsai., 2004b) protokollját használtuk, 4°C-on végezve minden centrifugálást. Eredményeink alapján valóban tiszta szimbioszóma-membrán kinyeréséhez a protokollt az ER-izolálásból hátra maradt anyagból érdemes elvégezni, így szorítva minimálisra az ER-szennyeződést, hisz a két endomembrán rendszer összenőve található a növényi sejtekben.

A folyékony nitrogénben előrölt gümőket felvettük ugyanakkora térfogatú extrakciós puffer 1-ben (0,5 M szukróz, 50 mM HEPES pH 7.4, 10mM DTT, 1% (v/v) proteáz inhibitor koktél), majd miután átengedtük 10 µm pórusátmérőjű szűrőn, 1 percig centrifugáltuk 10000 g-n (az ER-izolálásból hátramaradt anyagon elegendő a centrifugálást elvégezni). A pelletet újra felvettük 0,5 ml extrakciós puffer 1-ben és 0,5 ml extrakciós puffer 2-re (1,5 M szukróz, 50 mM HEPES pH 7.4, 10mM DTT, 1% (v/v) proteáz inhibitor koktél) rétegeztük. Ezt 1 percig centrifugáltuk 5000 g-n, majd a gradiens határán elkülönülő és az afölött lévő réteget leüleptítettük 2 perc centrifugálással 10000 g-n. A pelletet felvettük 0,5 ml extrakciós puffer 1-ben és 0,5 ml extrakciós puffer 3-ra (1 M szukróz, 50 mM HEPES pH 7.4, 10mM DTT, 1% (v/v) proteáz inhibitor koktél) rétegeztük, és 5 percig centrifugáltuk 10000 g-n. A pelletet felvettük 0,5 ml extrakciós puffer 1-ben, és Pasteur pipettával óvatosan szuszpendálva szétörtük a szimbioszóma membránt, majd 10000 g-n centrifugáltuk 1 percig. A pelletet felvettük 0,5 ml extrakciós puffer 1-ben, és még kétszer megismételtük az előző lépést, így a végén ez lett a szimbioszóma-membrántól megszabadított bakteroid frakció (ami a mikroszkópos vizsgálatok alapján infekciós fonalakat és az abban található baktériumokat tartalmazza), míg a három lépésnél egybegyűjtött felülúszót 3 órán át centrifugáltuk 26000 g-vel. A tiszta szimbioszóma membránt tartalmazó pelletet végül 100 µl pufferben (50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,25% DDM) vettük fel.

1 g érett R108 gümőből 2350 µg szimbioszóma membrán-fehérjét sikerült izolálnunk.

A kinyert szimbioszóma membrán tisztaságát (ER-membrán mentességét) az ER membránban található kalnexin fehérjére specifikus ellenanyaggal végzett Western blot analízissel ellenőriztük.

3.4.4. A szintetikus szignál peptidek és Western blot

A szintetikus szignál peptideket vízben oldottuk fel. Habár az NCR SP-k is nehezen oldódtak nagyon magas hidrofobicitásuk miatt, az oldódás még nagyobb gond volt a nodulin 25 (Nod25, Medtr3g055440) SP és a kalmodulinszerű protein (CaML2, Medtr3g055585) SP esetében, ráadásul ez utóbbi egy általunk kipróbált oldószerben (víz, DMSO, izopropanol, ecetsav) sem maradt stabil, így vizsgálni sem tudtuk. Az SPP-specifikus inhibitor (Z-LL)₂ ketont DMSO-ban oldottuk fel 1 mM-os végkoncentrációban.

A reakciók összeállításánál különösen nagy figyelmet szenteltünk annak, hogy az emésztett és nem emésztett minták pontosan ugyanannyi szintetikus peptidet tartalmazzanak, így a kétszeres mennyiségben összerakott mintákhoz a kettéválasztás után tettük hozzá az ER-membránt, illetve az üres puffert. Az SPP-gátlás vizsgálatok a kétszeres mennyiségben összerakott minta a szintetikus peptid mellett az ER-membránt is tartalmazta és a kettéválasztás után tettük hozzá a (Z-LL)₂ ketont, illetve az oldószerét, a DMSO-t.

1 ng szintetikus szignál peptideket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten 1300 rpm-n rázatva kezeltük a membrán kivonatokkal. Az SPP-specifikus inhibitor, (Z-LL)₂ keton csak magas, 200 mM koncentráció mellett és rövidtávon fejtett ki védőhatást, így ennek vizsgálatok 20 percenként vettünk mintát, és azokat azonnal inaktívtuk az SDS tartalmú mintapufferrel.

A mintákat felvettük mintapufferben, 10 percig forraltuk 95°C-on, 5 percig centrifugáltuk 13300 rpm-el, majd felvittük 12%-os akrilamid géltre, ami méret szerint választja el a fehérjéket. A mintákat tartalmazó gélt egy éjszaka során PVDF membránra blottoltuk, amit másnap a HA antigén tagre specifikus, nyúlban termeltetett elsődleges ellenanyaggal, majd ezt követően a torma peroxidáz fehérjével fuzionált nyúl IgG-specifikus másodlagos ellenanyaggal hibridizáltuk. Az eljárás során a torma peroxidáz a hozzá adott kemilumineszcens szubsztráttal reagált, mely reakció során keletkező fotonok jelet égettek a ráhelyezett fényérzékeny filmre, ezzel mutatva az SP jelenlétét vagy hiányát, azaz az ER-membrán és a feltételezett SPP aktivitását.

Kis mennyiségben használtuk a SP-eket (1 ng) és az ER membránt (300 ng), ezért nem használtunk loading kontrollt, mivel ezek a minták túl kevés fehérjét tartalmaznak ahhoz, hogy a Ponceau megfesse azokat.

3.4.5. HA jelölt szintetikus peptidek és *M. truncatula* gümőfehérjék kötődésének vizsgálata affinitás kromatográfiával

A folyékony nitrogénben eldörzsölt gümőköt (7, 11, 14, 17 napos gümők) azonos térfogatú PBS puffert (pH 7.4) adtunk, majd felszuszpendálás után 10 percig centrifugáltuk 13300 rpm-mel, 4°C-on. A felülúszót ismét 10 percig centrifugáltuk 13300 rpm-mel, 4°C-on, majd az újabb, nagyobb tisztaságú felülúszót öt egyenlő részre osztottuk, mindegyikhez 20 µg szintetikus peptidet adva (HA, NCR120 SP, NCR216 SP, NCR247 SP, NCR252 SP. Aminosav-szekvenciák a 3. függelékben találhatóak meg. A szignál peptidek C-terminális végén egy HA-tag volt, míg az N-terminális részen lévő StrepII-tag hibás szintézis miatt nem működött). Ezt PBS-el ekviribált mágneses gyöngyökre (Miltenyi Biotec) mértük, melyhez előzetesen hozzáadtunk 30 µl HA-epitóp specifikus egér G1 immunoglobulin tartalmú oldatot (µMACS Anti-HA MicroBeads, Miltenyi Biotec), és 20 percig inkubáltuk 4 fokon. A gyöngyöket háromszor mostuk 2 ml PBS-el, majd kétszer 1 ml 25 mM ammónium-bikarbonát pufferrel (NH₄HCO₃). Ezután a mágneses gyöngyökhöz kikötődött fehérjéket 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten 20 µl 25 mM ammónium-bikarbonát pufferben, mely során a hozzáadott 12,5 ng/µl tripszin leemésztette a fehérjéket, és a 10 mM ditiotreitolt (DTT) redukálta azokat, megszüntetve a stabilizáló diszulfid-hidakat. Ezután 50 µl 55 mM jódacetamid tartalmú 25 mM ammónium-bikarbonát puffer hozzáadásával egy éjszakán át szobahőmérsékleten alkileztük a mintát, blokkolva a redukálás során szabaddá vált SH-csoportokat. Másnap a fehérjeoldatot kétszer visszamértük a mágneses gyöngyökre megtisztítva azt és az elúciót 5 µl 10%-os hangyasavval kezeltük, leállítva a tripszines emésztést. A mintákon LC-MS/MS (folyadékkromatográfia-tömegspektrometria) analízist végeztek.

3.5. Antimikrobiális módszerek

3.5.1. Mikroba törzsek és peptidszintézis

A kísérletekhez a Gram pozitív *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (HNCMO112011), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) és a Gram negatív *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13440), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978)

baktérium- (ATCC, USA és NCTC - National Collection of Type Cultures, Anglia), valamint a *Candida albicans* W01 (Ördög és mtsai., 2014) törzseket használtuk.

Az NCR peptidek szintézisét (CaNCR13, CaNCR63, MsNCR443, PsNCR349, PsNCR352, mind C-terminális karboxil-csoporttal) a ProteoGenix (Franciaország), míg az NCR-származékok szintézisét (CaNCR63₁₋₂₀, CaNCR63₁₅₋₃₄, MsNCR463₁₆₋₃₅, MsNCR463₁₇₋₃₀, PsNCR349₂₆₋₅₀, PsNCR349₃₁₋₅₀, mind C-terminális amid-csoporttal) a kooperációs partnerünk (SZTE, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet) végezte.

3.5.2. A peptidek antimikrobiális aktivitásának vizsgálata

A friss baktérium- és élesztőkultúrát OD₆₀₀=0,01-re kihígítva (~10⁷ sejt logaritmikusan növekedési fázisban) 3 órán át kezeltük 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,125, 6,25, 12,5, 25 µM NCR-el 20 mM kálium-foszfát pufferben (pH 7.4), majd ebből 5 µl-t csöppentettünk LB agarózra. Kontrollként 0,1-10240 µM ampicillin antibiotikumot (Merck) és mikonazol antifungális vegyszert (Duchefa Biochemie) alkalmaztunk. A legalacsonyabb peptidkoncentráció, mely teljes mértékben megakadályozta a mikrobatelep növekedését, a minimális gátló koncentráció (minimális baktericid koncentráció, MBC vagy minimális fungicid koncentráció, MFC).

3.5.3. A peptidek biofilm bontásának vizsgálata

Annak céljából, hogy az NCR-ek hatását a már kialakult biofilmekben teszteljük, OD₆₀₀=0,1-es *A. baumannii* és *C. albicans* sejteket inkubáltunk mintánként 200 µl LB-t vagy YPD-t tartalmazó 96-lyukú plate-ben, 37°C-on 48 órán át. Ezután 160 µl-t óvatosan eltávolítottunk, a lyukak falán hagyva a biofilmet, majd 200 µl-re egészítettük ki 0, 25, 50 vagy 10 µM NCR-t tartalmazó hatszor hígított LB-vel vagy YPDA-val. A hígítás az NCR aktivitásának megőrzése miatt szükséges, de így a mikrobák is képesek növekedni. 24 óra kezelés után a ki nem tapadt sejteket eltávolítottuk, majd a hátra maradt biofilmeket kétszer mostuk PBS-el (pH 7.4). A biofilmeket 35 µl 0,1% metanolban oldott kristályibolyával festettük egy órán át szobahőmérsékleten, majd a maradékot desztillált vízzel mostuk ki, kétszer öblítve át a lyukak falát. A megfestett biofilmeket egy éjszakán át szárítottuk szobahőmérsékleten, majd 200 µl 96%-os alkohollal szolubilizáltuk. A biofilm mennyiségét 570 nm-en mértük (Hidex Sense Microplate Reader,

Plate Reader Software, verziószám: 5064). A kezeltlen biofilmet vettük 100%-nak és ehhez viszonyítottuk a kezelésekre hatására lecsökkent biofilm mennyiséget. Az átlagot (mean) és szórást (SD, standard deviation) három kísérlet eredményei alapján számítottuk ki.

3.5.4. DNS-kötő vizsgálat

100 ng linearizált és HindIII restrikciós endonukleázzal emésztett Lambda fág DNS-t (Lambda DNA/HindIII marker, Thermo Scientific) inkubáltunk 0, 5 vagy 10 μ M vízben oldott szintetikus peptiddel, majd mindezt fél óra után megfuttattuk 1%-os agaróz gélen. Az elektroforézis során a szabad DNS fragmentek a gélbe futottak, míg a peptid által megkötött és aggregálódott DNS a zsebben maradt.

3.5.5. Humán vörösvérsejtek hemolízisének vizsgálata

A kísérlethez szükséges vért a Szegedi Regionális Vérellátó Központ szolgáltatta. A 10 ml EDTA-tartalmú vért addig mostuk (1 perc centrifuga 1500 g-n és TBS – 10 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl), míg a felülúszó színtelenné nem vált, majd a sejteket felvettük 12 ml TBS-ben és ebből 100-100 μ l szuszpenziót inkubáltunk 1 órán át 37°C-on 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 és 100 μ M NCR jelenlétében. Ezután a sejteket 1 percig centrifugáltuk 1500 g-n, majd a felülúszót steril 96-lyukú plate-be tettük, és a felszabadult hemoglobin szintjét OD₅₆₀-on mértük (Hidex Sense Microplate Reader, Plate Reader Software, verziószám: 5064). A csupán TBS-ben lévő sejtek értéke szolgált alapszintként, míg a 0,5% Triton X-100-al (Serva) kezelt minta 100% hemolízisnek.

3.6. Programok

Szekvenciaillesztéshez a Clustal W version 2.1 (Larkin és mtsai., 2007), a Jalview version 2.11.0 (Waterhouse és mtsai., 2009) és a Weblogo (Crooks és mtsai., 2004) programokat használtuk.

A filogenetikai fák elkészítéséhez a MEGA-X version 10.0.5 (Kumar és mtsai., 2018) programot használtuk.

Az SP-eket a SignalP 5.0 (Almagro Armenteros és mtsai., 2019), a *h*-régiókat és a TMD-
ket a TMHMM (Krogh és mtsai., 2001) webprogramokkal határoztuk meg.

Az NCR peptidek izoelektromos pontját (pI) és nettó töltését (net charge, NC) a <https://pepcalc.com/> webprommal számoltuk ki, míg a többi fizikokémiai tulajdonságot a DBAASP v3 webprogrammal (Pirtschalava és mtsai., 2021).

A diagramok elkészítéséhez a GraphPad Prism version 5.01 (San Diego, California USA, www.graphpad.com) programot használtuk.

A 11. ábra elkészítéséhez a biorender.com webprogramot használtuk.

A Venn diagram elkészítéséhez a Venny 2.1.0 webprogramot használtuk: bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny (Oliveros, 2007-2015).

4. EREDMÉNYEK

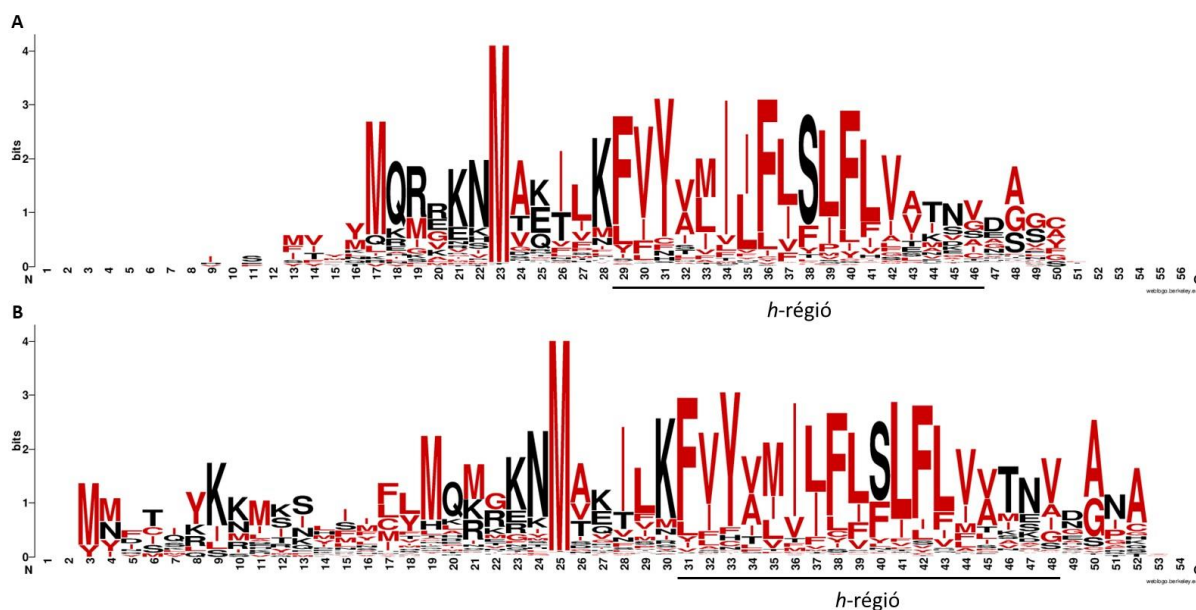
4.1. Az NCR-ek evolúciója

Az NCR gének általában 2 exonból állnak, amelyek közül az első exon a szignál peptidet (SP) kódolja, míg a második és esetenként a harmadik exon kódolja az érett peptidet, amelyik az SP nélküli, bakteroidba jutó aktív forma. A hírvivő RNS-ek (mRNS) translációja a citoplazmában lévő szabad riboszómákon kezdődik el és először a fehérje N-terminális része kezd el kialakulni. Amennyiben az N-terminális rész egy SP, ami egy nagy mértékben hidrofób peptid, úgy felismeri a szignál felsimerő részecske (SRP) és a mRNS-SP-riboszóma komplexet az endoplazmatikus retikulum (ER) membránhoz szállítja, ahol befejeződik a transláció. A SP-ek evolúciója általában gyorsabb az érett fehérjéénél, hiszen nem csak a szinoním mutációk (amikor a nukleotid változása nem jár aminosav változással), hanem sok nem-szinoním mutáció (amikor a nukleotid változása aminosav változással jár) sem változtatja meg lényegesen a hidrofóbicitásukat, hiszen a hús fehérjekódoló aminosavból tizenegy hidrofób vagy hidrofób oldallánccal rendelkezik (Williams és mtsai., 2000). Ellenben az NCR-ek esetében az érett peptidek diverzek, feltehetően a baktériumokkal való közvetlen kapcsolatuk miatt (az immunfehérjékhez hasonlóan (Williams és mtsai., 2000)) és a SP-ek konzerváltak. Az NCR-ekre nehezedő szelekciós nyomás hatására a génduplikációval kialakuló NCR-ek (paralógok) új funkciót vehetnek fel (szétválasztó vagy más néven diverzifikáló szelekció), míg az NCR SP-ek szekvenciája kevésbé változik (stabilizáló szelekció) (Alunni és mtsai., 2007), ami ellentétes a legtöbb SP-nél megfigyelttel (Williams és mtsai., 2000).

A munkám során az összes *M. truncatula*, valamint több IRLC faj NCR peptidjeinek, illetve más kládok NCR-szerű peptidjeinek evolúcióját vizsgáltam közel kétezer peptid bevonásával.

4.1.1. Az NCR szignál peptidek konzerválódása

A 753 rendelkezésünkre álló MtNCR peptid szekvenciából a SignalP webprogram alapján 722 rendelkezik prediktált SP-del, melyek közül 627 elég hidrofób (TMHMM webprogram alapján) ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani a hidrofób *h*-régióját, azaz az ER membránba ágyazódó szakaszt. Erről a 627 NCR-ről joggal feltételezhetjük, hogy nem pszeudogének és a szimbioszómába lokalizálódnak, így ezek vettek részt az analízisünkben (12. ábra).



12. ábra. Az NCR szignál peptidok *h*-régiója, az aminosavak előfordulási gyakorisága és a hélix-törő szerin konzervált pozíciója.

Aminosavak előfordulási gyakorisága (frekvenciája) 627 *M. truncatula* (A) és 1034 IRLC (B) NCR szignál peptid (SP) esetében. Az oszlop magassága jelzi, hogy az adott pozíció mennyire konzervált (a skála maximuma 4 bit), míg ezen belül a szimbólum magassága jelzi a gyakoriságát az adott pozícióban. *h*-régió: Az SP-k ER membránba illeszkedő, elsősorban hidrofób aminosavak által alkotott szakasza. Piros: hidrofób aminosavak (A, C, F, G, I, L, M, P, V, W, Y), fekete: hidrofil aminosavak (D, E, H, K, N, Q, R, S, T). Az ábra a Weblogo webprogrammal készült: <https://weblogo.berkeley.edu/>

A legtöbb (159) NCR SP-je 26 aminosav (aa) hosszúságú, 112 db 24 aa és 103 db 23 aa hosszúságú, míg a többi NCR SP a 20 és 45 aa közötti tartományba esik. Az átlagosan 18 aa *h*-régió első 14 aminosava a legtöbb NCR SP-ben megegyezik (FVYV/AM/LII/LFLSLFLV), amit megelőz egy konzervált lizin (K). A *h*-régió előtt 6 aminosavval az NCR SP-ek közel 100%-ában található egy metionin (M), ami a legtöbb esetben a lánckezdő aminosav, habár ezt sok esetben megelőzheti még hat aminosav (12A. ábra). A nem-Mt IRLC NCR SP-k (12B. ábra) szinte teljesen megegyeznek a *M. truncatula* NCR SP-ekkel, elsősorban a *h*-régió és az azt megelőző tizenkét aminosav, beleértve a két fent említett metionint, de a nem-Mt IRLC NCR SP-k N-terminális része gyakrabban hosszabb és több metionint is tartalmaz konzervált pozíciókban.

Feltűnő, hogy az NCR SP-k nagy részében a tisztán hidrofób aminosavakból álló *h*-régióban található egy hidrofil szerin (S), mégpedig konzervált pozícióban. A S és a cisztein (C) hélix-törő vagy destabilizáló aminosav, melyek megbontják az α -hélix szerkezetét és így lehetőség nyílik a szignál peptid peptidáz (SPP) számára, hogy itt elhasítsa a *h*-régiót és vele együtt a transzmembrán domént (TMD) (Lemberg és Martoglio, 2002; Voss és mtsai., 2013). A 627 MtNCR SP *h*-régió közül 533 (85%) tartalmazza a két aminosav egyikét, azaz SPP

célpontnak tekinthető. Az 533-ból 304 esetben csak egy hélix törő vagy destabilizáló aminosav található a *h*-régióban (57%), 171 MtNCR SP-nél kettő (32%), 30-nál három (6%), míg nyolcnál négy ilyen aminosav is potenciális SPP célponttá teszi az SP-t (2%). C 112 darab SP *h*-régióban található (az 533 21%-a), míg S 499-ben (94%).

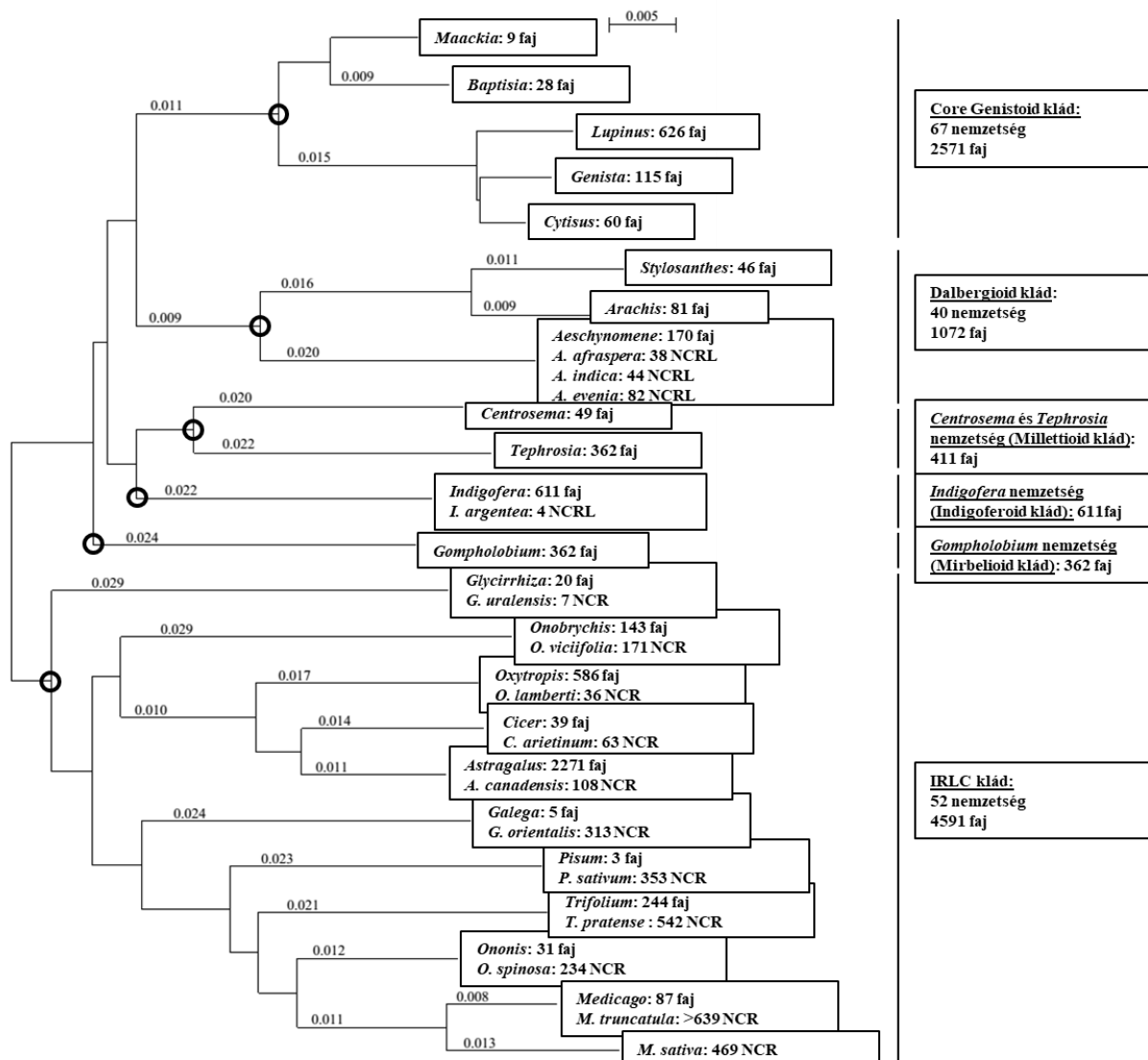
A S nem csak felülreprezentált az MtNCR SP *h*-régiókban, de jelentős részük konzerválódott: az átlagosan 18 aminosav hosszúságú NCR SP *h*-régiók 72%-ában a tizedik aminosav S. Kilenc további IRLC növény (*A. canadensis*, *C. arietinum*, *G. orientalis*, *G. uralensis*, *O. spinosa*, *O. viciifolia*, *O. lambertii*, *P. sativum*, *Trifolium pratense*) 1034 darab NCR SP *h*-régiójából 803-ban (78%) található meg legalább egy C vagy S, ami 752 esetben S (94%). A szekvenciaillesztés alapján a *M. truncatula* NCR SP *h*-régiók (17A. ábra) szinte teljesen egyeznek a kilenc IRLC NCR SP *h*-régióival (17B. ábra), ami rendkívül magas fokú konzerváltságra utal, és amelyben a hélix-törő S is nagymértékben konzerválódott.

4.1.2. Az érett NCR peptidek változatossága és strukturális jellemzői

Az NCR géneket először *M. truncatula*-ban írták le (Mergaert és mtsai., 2003), de azóta kiderült, hogy az IRLC minden fajában megtalálhatók, hisz eddig mind a 13 vizsgált nemzetség összesen 16 vizsgált fajában azonosítottak ilyen géneket, még a legősibb *G. uralensis*-ben is (Frühling és mtsai., 2000; Istvánék és mtsai., 2014; Montiel és mtsai., 2017; Durán és mtsai., 2021; Huang és mtsai., 2022). Meglepőbb felfedezés volt, hogy a távoli rokon Dalbergioid klád vizsgált fajai, *Aeschynomene afraspera*, *A. evenia*, *A. indica*, valamint a földimogyoró (*Arachis hypogaea*) és vad ősei (*A. duranensis* és *A. ipaensis*) (Czernic és mtsai., 2015; Bertoli és mtsai., 2016; Raul és mtsai., 2022) és eddig nem publikált eredmények alapján a Indigoferoid klád eddig elemzett tagja, az *Indigofera argentea* (Ren, disszertáció, 2018) is termelnek gümőspecifikus NCR-szerű peptideket.

Ezen fajok gümőiben a bakteroidok terminálisan differenciáltak, ahogy a bükkönyformák (*Faboideae*) alcsaládjának további három kládjának (Core Genistoid, Millettoid, Mirbelioid) vizsgált fajaiban is, így ezt a jelenséget összesen a hat klád esetében 30 nemzetség 39 fajánál írták már le (Bergersen, 1955; Dart és Mercer, 1966; Chandler, Date, és Roughley, 1982; Golinowski, Kopcińska, és Borucki, 1987; Higashi és mtsai., 1987; Loureiro és mtsai., 1994; Lavin és mtsai., 2001; Frühling és mtsai., 2000; Wojciechowski, Lavin és Sanderson, 2004; Lavin, Herendeen és Wojciechowski, 2005; Chou és mtsai., 2006; Mergaert és mtsai., 2006; Elliott és mtsai., 2007; Sprent, 2007; Oono és mtsai., 2010; Czernic és mtsai.,

2015; Istvánék és mtsai., 2014; Montiel és mtsai., 2016; 2017; Skawińska és mtsai., 2017; Karmakar és mtsai., 2018; Kalita és Małek, 2020) (13. ábra). A szimbióta irreverzibilis átalakításának képessége legalább öt alkalommal alakult ki egymástól függetlenül a bükkönyformáknál (Oono és mtsai., 2010), ebből kettő bizonyos és egy valószínűsíthető esetben ismertek a (részben) felelős faktorok: az NCR-ek és az NCR-szerű peptidek. A hat fent említett klád összesen 230 nemzetséget és több mint tíz ezer fajt számlál, melyek nagy részénél valószínű a terminális bakteroid differenciáció, és így feltételezhető az azt kiváltó NCR-ek vagy NCR-szerű peptidek jelenléte is.

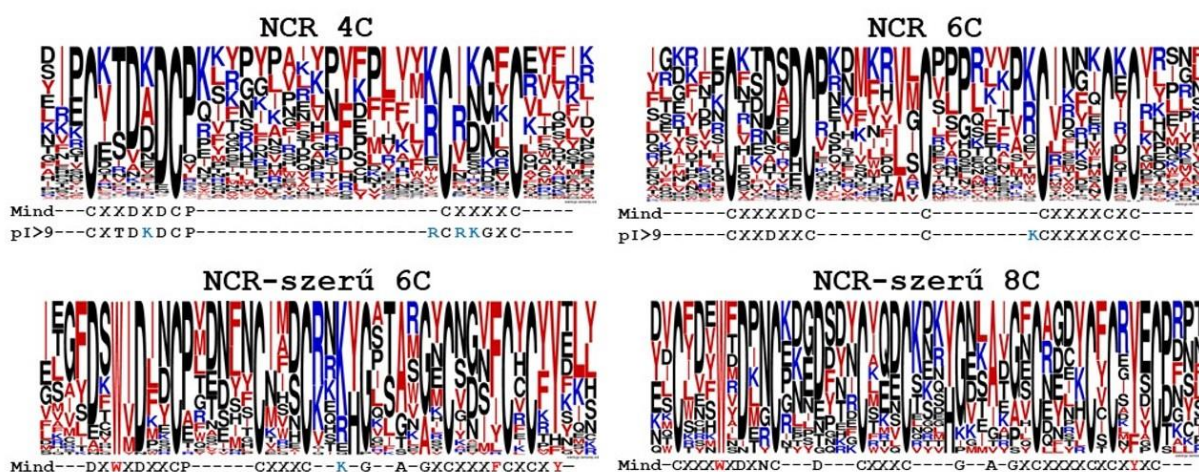


13. ábra: Filogenetikai törzsfá *matK* génszekvenciák alapján azon bükkönyforma (*Faboideae*) nemzetségekből, melyek gümőiben terminális bakteroid differenciáció figyelhető meg.

Sorban: nemzetség; fajok száma; azon faj vagy fajok, melyben leírták a bakteroid differenciációt; NCR vagy NCRL gének száma, amennyiben ismert. A törzsfá elkészítéséhez az egyes fajok maturáz K (*matK*) génjének szekvenciáit hasonlítottuk össze, tízezer ismétléses bootstrap analízist alkalmazva. Az ághossz az evolúciós rokonsággal arányos, mutáció/nukleotid a közös őshöz képest.

4.1.2.1. Az NCR és NCR-szerű peptidek aminosav szekvenciájának összehasonlítása

Szemben a SP-ek konzerváltságával, az érett NCR peptidek nagymértékben különböznek egymástól. Ennek ellenére konzervált aminosavak találhatók a ciszteineken kívül is, amit a négy (NCR 4C), illetve a hat (NCR 6C) konzervált ciszteint tartalmazó *M. truncatula* NCR peptidek és a hat (NCR-szerű 6C), illetve a nyolc (NCR-szerű 8C) konzervált ciszteint tartalmazó *Aeschynomene* (Dalbergioid) NCR-szerű peptidek szekvenciaillesztése mutat (14. ábra).



14. ábra. Az NCR és NCR-szerű peptidek aminosav sorrendje.

Az aminosavak előfordulási gyakorisága az egyes pozíciókban (frekvenciája) és konzervált mintázatok érett *M. truncatula* NCR-ek és Dalbergioid NCR-szerű peptidek esetében. A betűk magassága az egyes oszlopokban az aminosavak relatív frekvenciája az adott pozíciókban. Az aminosavak színezettsége: kék a pozitívan töltött (K, R), piros a hidrofób (A, F, I, L, M, V) és amfipatikus (X, Y), míg a többi aminosav fekete. Az aláhúzott glicin (G) az NCR-szerű peptideknél jelzi a γ -mag motívumot (GXCX_nC).

Az aminosavak változatossága miatt az *M. truncatula* NCR-ek izoelektromos pontja (pI) széles skálán, 3,5 (erősen anionos) és 11,25 (erősen kationos) között mozog. Az *M. truncatula* NCR-ek 35%-a anionos, 23%-a neutrális és 42%-a kationos, valamint közel azonos az NCR 4C-t és NCR 6C-t kódoló gének száma.

A konzerváltság az NCR 4C esetében a legnyilvánvalóbb, ahol a C1 (első konzervált cisztein) és C2 között nagy arányban található egy treonin (T), két aszparaginsav (D) és közvetlenül C2 mögött egy prolin (P), ami valószínűleg a diszulfid-hidat és a peptid struktúráját módosítja (Kang és mtsai., 2007). A 9-nél magasabb izoelektromos pontú (pI>9), azaz erősen kationos NCR 4C peptidek esetében a pozitív töltésű arginin (R) és lizin (K) aminosavak is átlépik a 60%-os gyakoriságot, elsősorban a C-terminális végen, ami a kationosság elsődleges oka és ami az antimikrobiális peptidekre (AMP) jellemző motívum. A pI>9 NCR 4C-nél ezen

két aminosav közül egyre inkább dominál az R, aminek nagyobb a pozitív töltése fiziológiai pH-n, mint a K-nek, míg az erősen kationos NCR 6C-nél ez nem figyelhető meg.

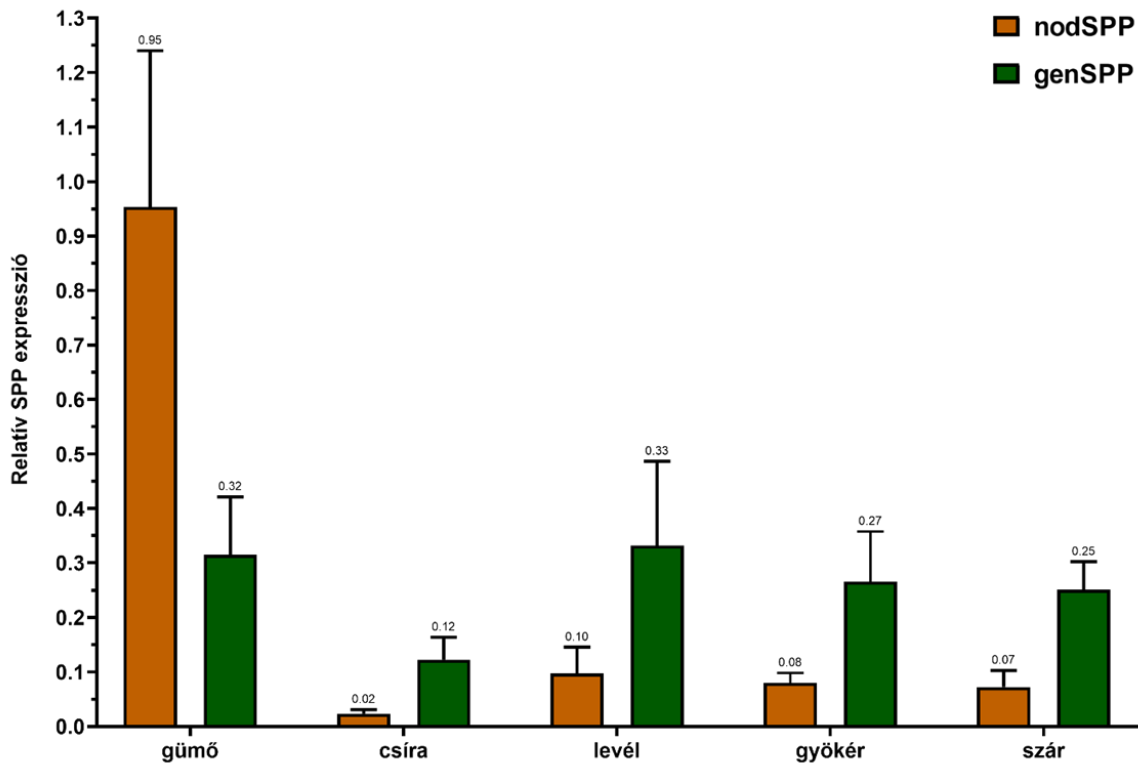
NCR 6C-nél jóval kevésbé konzerváltak az aminosavak, habár az NCR 4C-nél 60%-os határt elérő aminosavak itt is gyakoriak, de a legtöbb esetben nem érik el ezt a szintet. A C5 és C6 között egyetlen esetben sincs P, sem *M. truncatula*-ban, sem az összes elérhető, közel 1400 IRLC NCR 6C esetében sem, aminek valószínűleg strukturális okai lehetnek (Kim és mtsai., 2015).

Az NCR-szerű peptidcsalád tagjaira is jellemző a változatos aminosav-szekvencia. Ezekre a peptidekre jellemző egy amfipatikus triptofán (W) megléte az N-terminális részen a C2 előtt öt hellyel. Hasonlóképpen a W megtalálható a növényi defenzinekénél, de itt négy hellyel a C2 előtt. Az N-terminális végen itt is található egy D és az NCR-szerű 6C esetében egy P is, habár itt a C1, és nem a C2 környezetében. Az NCR-szerű 6C peptidek esetében egy erősen kationos régió is található C3 után, ami talán szükséges ezeknek a peptideknek az aktivitásához, annak ellenére, hogy az össztöltésük alapján neutrálisak vagy egyenesen anionosak. Az NCR-szerű peptideknél megfigyelhető több hidrofób vagy amfipatikus aminosav konzerváltsága (elsősorban az N-terminális W és a C-terminális tirozin (Y)), ami szintén AMP jelleg, habár a Gram negatív baktérium-ellenes AMP-kre kevésbé jellemző (Wang, 2020). A legtöbb NCR-szerű peptidnél megtalálható a γ -mag antifungális motívum (GXCX₃₋₉C, ahol a két C a defenzinek ötödik és hatodik konzervált ciszteinjére vonatkozik), ami az NCR-ek esetében ritka, de a növényi defenzinekénél megtalálható (Cools és mtsai., 2017; Tarr, 2016). Ellenben a defenzinek α -mag motívuma (GXCX₃₋₅C, ahol a két C a defenzinek második és harmadik konzervált ciszteinjére vonatkozik), melynek funkciója kevésbé ismert (Kaewklom és mtsai., 2018) hiányzik az NCR-ek, és az NCR-szerű peptidekből.

4.1.3. Az NCR-ek ko-evolúciója a gümőspezifikus szignál peptid peptidázzal

A *M. truncatula* gümő átmeneti zónájában (IZ) kifejeződik egy gümőspezifikus szignál peptid peptidáz (nodSPP) (Mergaert és mtsai., 2003; Maunoury és mtsai., 2010), aminek szerepe lehet az SP-k további fragmentálásában, ami az ER SP-ktől való megtisztításában játszhat szerepet. Az SPP minden eukariótában jelen van, de a *M. truncatula*-nál két SPP-t azonosítottak. Az NCR-ek a teljes gümő transzkriptom 5%-át teszik ki (Guefrachi és mtsai., 2014), így az NCR SP-k is nagy mennyiségben jelen vannak, ami szükségessé teheti egy gümőspezifikus SPP funkcióját. Az NCR transzkriptumok 55%-a az IZ-ban mutatható ki (Roux és mtsai., 2014)

adatai alapján). Annak megállapítására, hogy a nodSPP valóban gümőszerűen fejeződik ki RT-qPCR analízist végeztünk (15. ábra).



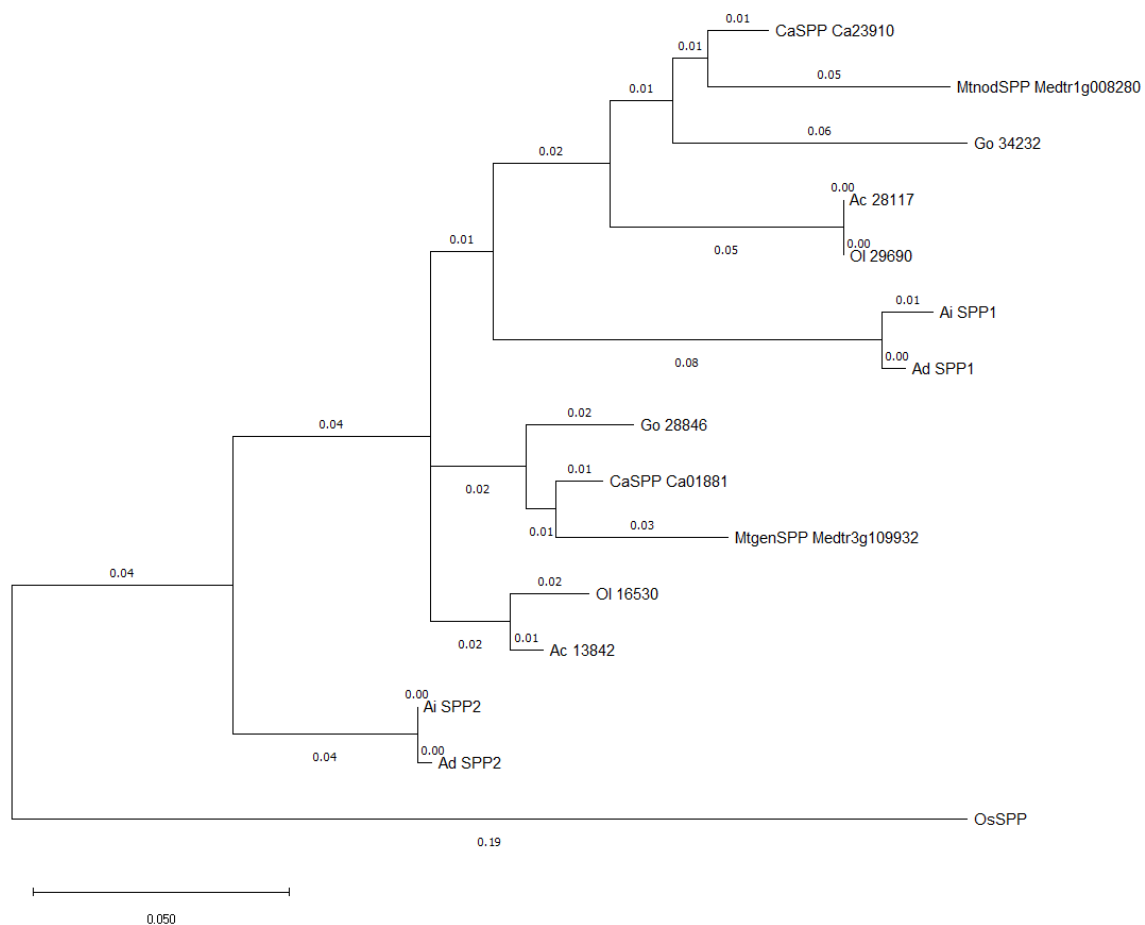
15. ábra. Az általános genSPP és a gümőszerűen nodSPP expressziója *M. truncatula* különböző szerveiben. Az mRNA-szintek a nodSPP gümőben mért szintjéhez lettek normalizálva, p érték < 0,0001 (****, two-way ANOVA) minden esetben.

M. truncatula-ban a nodSPP mRNA szintje lényegesen magasabb a gümőben, míg a többi szervben ennek csupán 2-10%-a, ami alátámasztja a gén gümőszerű kifejeződését vagy legalábbis gümő-indukált jellegét. A többi szervben is működő általános SPP (genSPP) mRNA mennyisége a gümőben csak harmadakkora, mint a nodSPP-é, és hasonló szintű a gyökérben, szárban, levélben, míg valamivel alacsonyabb a csírában.

Az expressziós mintázat alapján feltételezhetjük, hogy a génduplikáció után az egyik SPP (genSPP) megőrizte az általános, az egész növényre kiterjedő funkcióját, míg a nodSPP feladata elsősorban a gümőre korlátozódik. Génduplikáció hiányában a gének szövetspecifikitása általában konzervált, míg kis léptékű duplikáció után (amennyiben nem az egész genom kettőződik meg) az alacsonyabb expressziójú paralóg hamar szövetspecifikussá válhat (Kryuchkova-Mostacci és Robinson-Rechavi, 2016). Ezt tükrözi a nodSPP mRNA-szintje, ami

jelentősen alacsonyabb a gyökérben, szárban és levélben, mint a genSPP esetében, de azt messze túlszárnyalja a gümőben, ami a gümőre történő specializálódás folyamánya lehetett.

Mivel az NCR-ek IRLC-specifikusak, megvizsgáltuk, hogy más IRLC növényben, *M. truncatula*-hoz hasonlóan, jelen van-e *nodSPP*. Az elérhető IRLC gümő-transzkriptumok alapján (Montiel és mtsai., 2017) minden eddig vizsgált IRLC fajban két SPP paralóg található (16. ábra), még a legegyszerűbb *G. uralensis*-ben is, míg a legközelebbi rokon Robinoidokban (*L. japonicus*) csupán egy *SPP* gén van jelen, ami arra utal, hogy a génduplikáció a két csoport szétválása után, de az IRLC diverzifikációja előtt zajlott le.



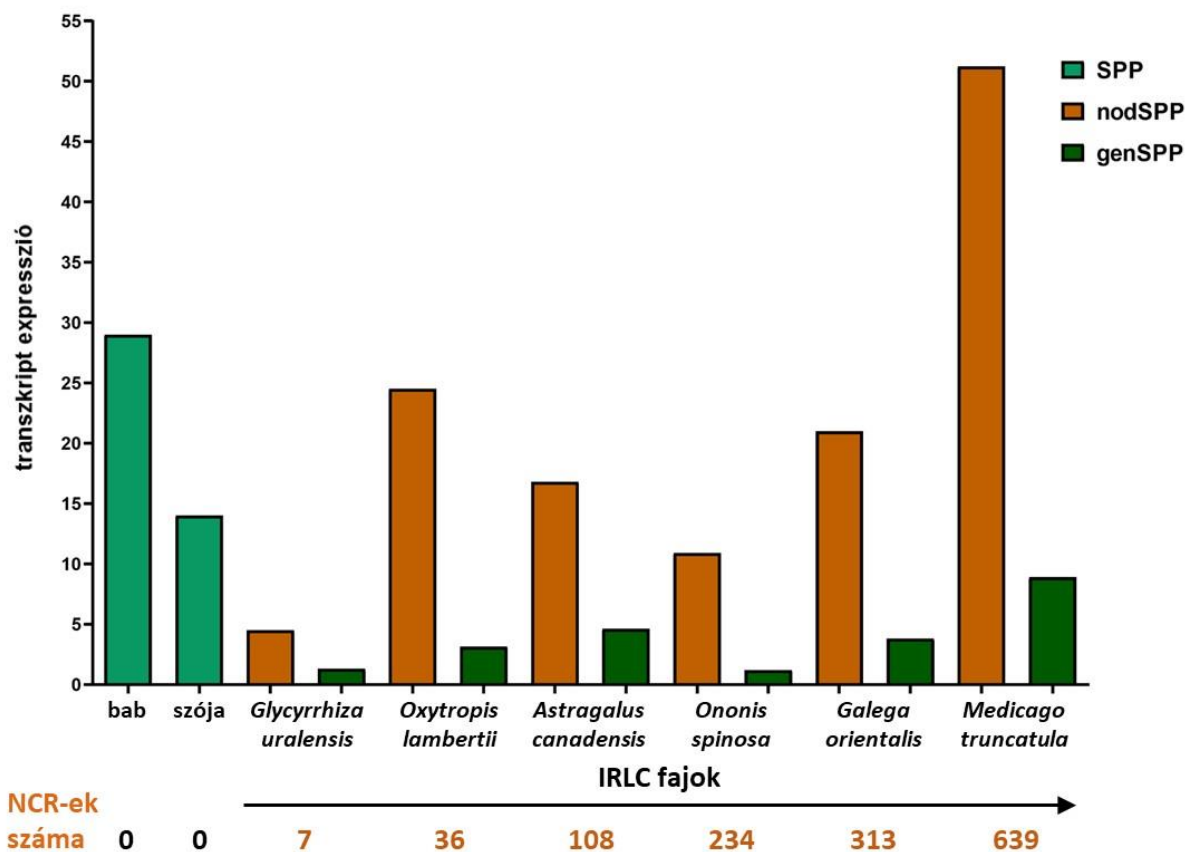
16. ábra. SPP filogenetikai fa.

IRLC: Ac: *Astragalus canadensis*, Ca: *C. arietinum*, Go: *Galega orientalis*, Mt: *Medicago truncatula*, Ol: *Ononis spinosa*. Dalbergioid: Ad: *Arachis duranensis*, Ai: *A. ipaensis*. Külső csoport: Os: *Oryza sativa* (egyszikű). A vizsgálathoz csak teljes vagy közel teljes SPP fehérjeszekvenciákat használtunk fel, ezért nem szerepel az összes tárgyalt faj.

Az analízis során mindegyik IRLC pillangós esetében az egyik SPP paralóg (Ac28117, Ca23910, Go34232, Ol29690) az Mt nodSPP-vel került egy csoportba, míg a másik IRLC SPP paralóg (Ac13842, Ca01881, Go28846, Ol16530) az Mt genSPP-vel. A vizsgálatba bevontuk

az allotetraploid földimogyorót (*Arachis hypogaea*), illetve a kétszeres kromoszómakészletük miatt jobban vizsgálható diploid őseit, az *A. duranensis*-t és az *A. ipaensis*-t, mivel az NCRL pepdiket termelő Dalbergioid növények közül ezeknek érhető el teljes genomja (Bertioli és mtsai., 2016) (a földimogyoró 55 NCRL-t kódol (Raul és mtsai., 2022)). Mindkét diploid *Arachis* faj két SPP paralóggal rendelkezik, melyek az IRLC SPP-duplikációtól függetlenül duplikálódtak, ráadásul ezekben a fajokban NCR-szerű peptidek is megjelentek az NCR-ektől függetlenül.

Ezek az expressziós eredmények nem alkalmasak különböző fajok összehasonlítására, hisz mindegyik egyed- és gümőfejlődése más-más ütemben zajlik le, de az látható hogy mind a hat IRLC faj esetében, ahol SPP szekvenciák és expressziós szintek elérhetők (Montiel és mtsai., 2017), a *Medicago* nodSPP ortológ mRNS-szintje jelentősebb magasabb a gümőben, mint a genSPP-é (17. ábra).



17. ábra. IRLC növényekben, hasonlóan *M. truncatula*-hoz, két SPP kópia van és a a nodSPP expressziós szintje a gümőkben bizonyos összefüggést mutat az adott fajban található NCR gének számával.

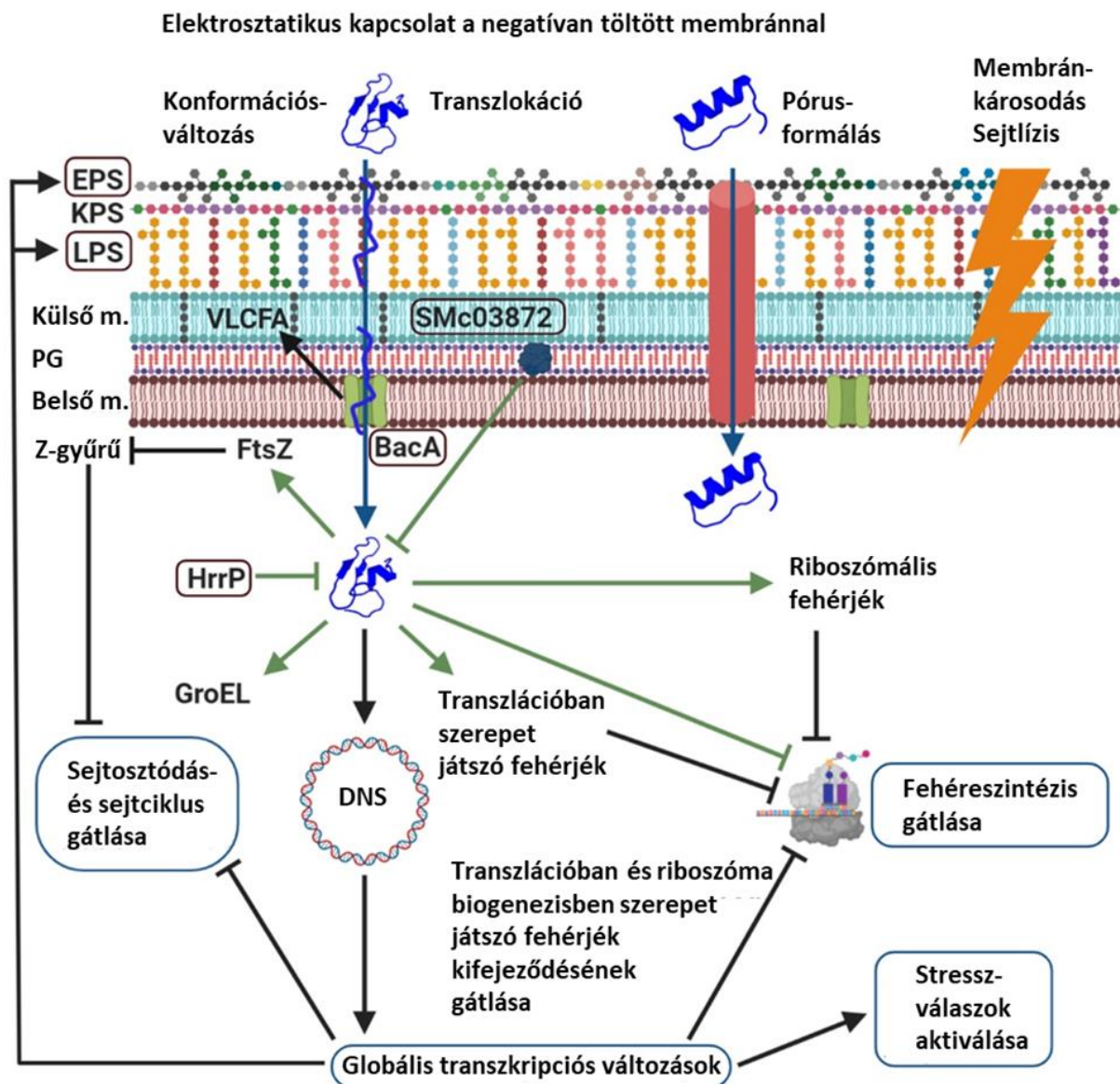
nodSPP: Gu52107, OI29690, Ac28117, Os15499, Go34232, Medtr1g008280.

genSPP: Gu52104, OI16529, Ac13842, Os15500, Go28846, Medtr3g109932.

4.2. Az NCR247 hatásmechanizmusa

Az NCR247 az NCR peptidcsalád legkisebb tagja. Az érett peptid 24 aminosav hosszúságú, 4 konzervált ciszteint tartalmaz, az izoelektromos pontja (pI) 10,15, a nettó töltése (net charge, NC) +6, a Boman-indexe 4,63 kcal/mol, ami magasabb az ismert fehérjék 99,86%-ánál (Farkas és mtsai., 2014). Az NCR247 (Medtr5g056815) a gümő ZIIp-jében kezd el kifejeződni, ahol elindul a bakteroidok differenciációja, majd IZ-ben éri el expressziója maximumát, ahol a terminális differenciáció jelentős része végbemegy, majd az expresszió lecseng a ZIII-ban (Farkas és mtsai., 2014). A ZIIp és az IZ határán abbamarad a bakteroidok osztódása és megkezdődik a megnyúlásuk, és ezzel párhuzamosan aktiválódik az endoreduplikáció. Az NCR247 döntő szerepet játszik ezekben a folyamatokban. *In vitro* kísérletekben gátolta a szabadon élő rhizobium Sm1021 osztódását, és a baktérium megnyúlását idézte elő (Farkas és mtsai., 2014). Az NCR247 szubletális 1,5 μM koncentrációban pórus kialakítása nélkül jut be Sm1021 baktériumokba, anélkül, hogy károsítaná a membránt, és ezáltal átjárhatóvá tenné a propidium-jodid (PI) számára (Farkas és mtsai., 2014). Magasabb koncentráció (5 μM) már károsítja a bakteriális membránt és gátolja a baktérium növekedését (Farkas és mtsai., 2014; Mikuláss és mtsai., 2016), míg ennél magasabb koncentráció (8 μM) külső membrán vezikulák kialakulásához és sejtpusztuláshoz vezet (Montiel és mtsai., 2017) A ciszteinek szükségesek az NCR247 *in vitro* antimikrobiális hatásához, de nem a diszulfid-híd képzés miatt, hisz ennek hiányában a redukált peptid még aktívabbá vált (Haag és mtsai., 2012; Ribeiro és mtsai., 2017; Shabab és mtsai., 2016).

A gümőfejlődés során az NCR-ek ellenére nem letálisak a bakteroidokra, melynek az egyik oka az lehet, hogy a peptidek koncentrációja a szimbioszómákban feltételezhetően jóval alacsonyabb (szubletális), továbbá az IZ sejtjeiben egyszerre több száz NCR is termelődik, a kationos peptidek mellett anionos és neutrális peptidek is, melyek kompenzálhatják az NCR247 és más kationos peptid baktériumölő hatását. Az NCR247 hatásmechanizmusának megértéséhez leginkább az affinitás kromatográfiás kísérletek világítottak rá, melyeknél *M. truncatula* gümőből izolált bakteroidokat, valamint intakt és feltárt szabadonélő baktériumokat inkubáltunk együtt StrepII és FLAG-taget hordozó érett NCR247 peptiddel (Farkas és mtsai., 2014) (18. ábra).



18. ábra. Az NCR247 összetett hatásmechanizmusa érinti a bakteriális membránt és számos biológiai funkciót a citoszolban.

BacA: az NCR-ek felvételében szerepet játszó ABC-transzporter, Belső m.: belső membrán, EPS: exopoliszacharid, FtsZ: szerepe a bakteriális sejtosztódás megindítása, GroEL: chaperon (dajkafehérje), Hrrp: peptidáz, bakteriális kompatibilitási faktor, KPS: kapszuláris poliszacharid, Külső m.: külső membrán, LPS: lipopoliszacharid, PG: peptidoglikán, Smc03872: peptidáz, bakteriális kompatibilitási faktor, VLCFA: nagyon hosszú láncú zsírsavak (very-long-chain fatty acids), Z-gyűrű: meghatározza a szeptum és azzal együtt a sejtosztódás helyét. Eredeti ábra: Lima és mtsai., 2020.

Az NCR247 egyik kölcsönható partnere a bakteriális sejtosztódás egy konzervált fehérjéje, az FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z), mely a sejtosztódást megelőzően polimerizálódik, és a sejtek középvonalán egy gyűrűt alakít ki, amelyre a szeptum fehérjék épülnek. Az NCR247 gátolja a szeptum-formálódást, feltehetően az FtsZ kötése által, megakadályozva annak polimerizálódását és végső soron a sejtosztódást is. Másik kölcsönható partnere a GroEL chaperon, amely fontos eleme a szimbiotikus rendszereknek, beleértve a *M.*

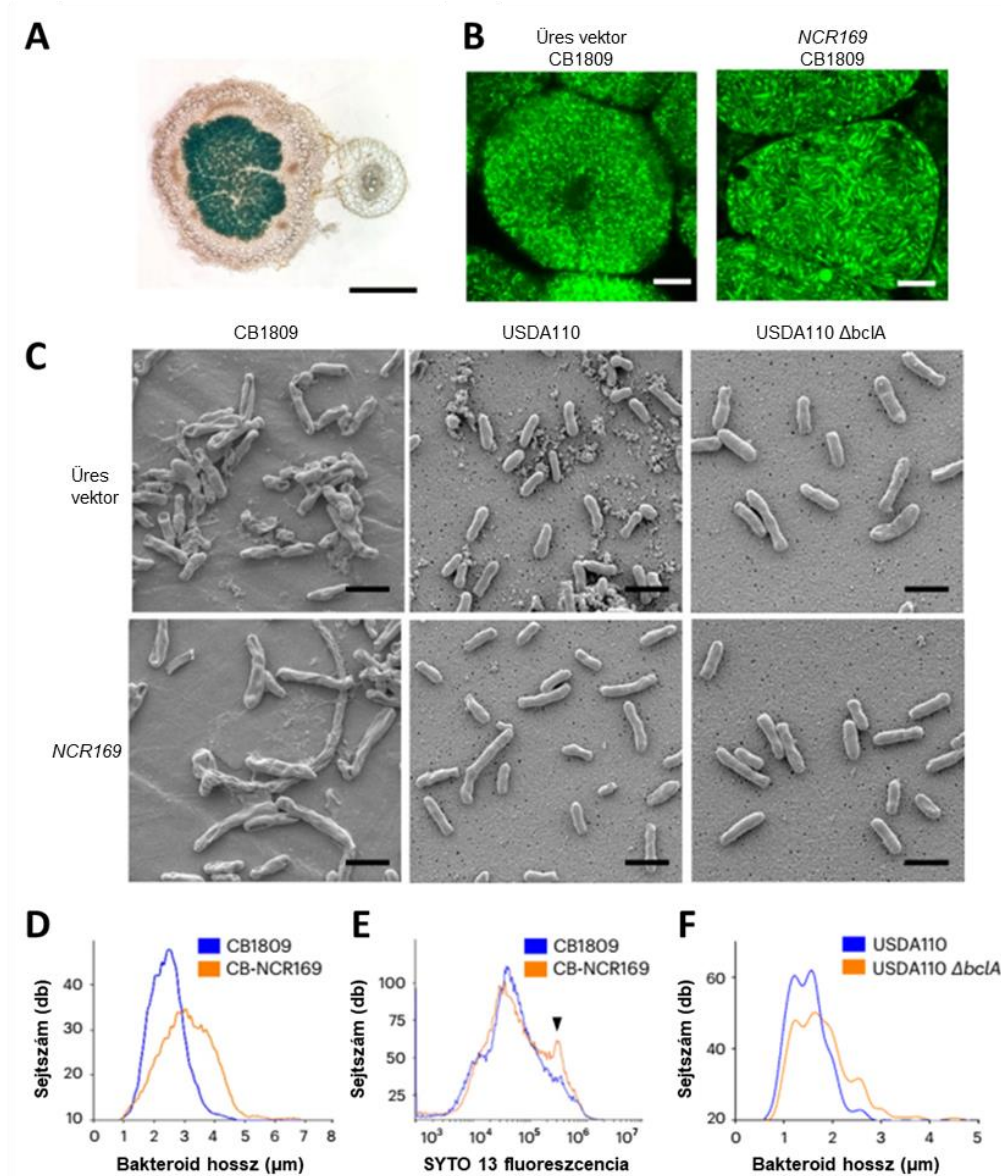
truncatula-S. meliloti szimbiózist is. Az NCR247 a GroEL-en keresztül számos fehérje szerkezetét és működését befolyásolhatja. Az NCR247 további partnerei közt vannak még riboszomális és a translációhoz szükséges fehérjék is (Farkas és mtsai., 2014). Az NCR247 gátolja a *dnaA*, *gcrA* és a *ctrA* sejtciklust szabályozó gének kifejeződését is (Penterman és mtsai., 2014), ami DNS megsokszorozódáshoz vezet és magasabb DNS mennyiséget eredményez (Shabab és mtsai., 2016). Az affinitás kromatográfiás kísérletek azt is kimutatták, hogy az NCR247 más NCR-ekkel is képes komplexet alkotni. A NCR247 jelentősen gátolta a riboszomális gének kifejeződését megváltoztatva a riboszómák összetételét a szabadon élő baktériumnál, ami hozzájárulhat a bakteroidok megváltozott fiziológiájához. *In vitro* kísérletekben az NCR247 koncentrációtól függően gátolta a fehérjeszintézist, és globális transzkripciók változásokat idézett elő (Farkas és mtsai., 2014).

Több bakteriális fehérjének is van közvetlen vagy közvetett hatása az NCR247 aktivitására. A BacA egy ABC transzporter (Karunakaran és mtsai., 2010), amelynek egyik feladata az NCR-ek bejuttatása a szimbiótába, és melynek hiánya NCR-rezisztenciát okoz *in vitro* (Haag és mtsai., 2011; Shabab és mtsai., 2016), míg a szimbiózisban megakadályozza a bakteroidok differenciálódását, és előidéz azonnali pusztulásukat (Berrabah és mtsai., 2015; Haag és mtsai., 2011). BacA-nak egy másik funkciója a nagyon hosszú láncú zsírsavak (very-long-chain fatty acids, VLCFA) szintézise, ami hatással lehet a bakteriális membrán szerkezetére, aminek a megfelelő állapota szintén elengedhetetlen a szimbiózishoz (Arnold és mtsai., 2017; Marlow és mtsai., 2009). Bakteriális peptidázok, így a külső membránban található SMc03872 és a citoszolban lévő HrrP képesek az NCR-ek hasítására, így ezek hiánya vagy megléte képes befolyásolni a szimbiotikus kompatibilitást a két fél között (Arnold és mtsai., 2017; Price és mtsai., 2015; Shabab és mtsai., 2016).

4.3. Az NCR gének működésének szabályozása

Az egyes NCR-ek hatásmechanizmusának megértése mellett ugyancsak fontos kérdés, hogy mi szabályozza az NCR-ek szimbiózis-specifikus kifejeződését. Mivel az NCR gének jelenléte IRLC-specifikus, így azt feltételeztük, hogy a szabályzásukat is IRLC-specifikus, az NCR-ekkel együtt kifejlődött transzkripciók faktorok (TF) végzik. Annak vizsgálatára, hogy az NCR promóterek aktívak-e nem-IRLC hüvelyekben, kiválasztottuk az *NCR169* promóterét, melyben megtalálható a 41 bp hosszú négyes motívum (Nallu és mtsai., 2013), ami 278 másik NCR promóterben is jelen van (4. függelék). Meglepő módon GUS aktivitást figyeltünk meg

az *NCR169* promóterrel szabályozott *GUS* riporter génnel transzformált nem-IRLC szójában, ahol a bakteroid differenciáció reverzibilis, ami igazolja, hogy az *NCR169* promóter aktív, és megfelelő expressziót biztosít szójában is (19A. ábra).



19. ábra. Az *NCR169* promóter aktív a szója gümőiben, ahol az *NCR169* expressziója a bakteroidok megnyúlását és genomméret-növekedését okozza

A. Az *NCR169* promóter által szabályozott *GUS* gén kifejeződése (kék szín) transzgenikus szójagümőben. **B.** *Bradyrhizobium japonicum* CB1809 bakteroidok SYTO 9/PI festett transzgenikus szójagümőben üres vektorral és a saját promóterével szabályozott *NCR169* génnel transzformálva. **C.** Vad típusú *B. japonicum* CB1809, *B. japonicum* USDA110 és *bclA* deléciós mutáns USDA110 bakteroidok üres vektorral és a saját promóterével szabályozott *NCR169* génnel transzformált szójagümőkben izolálva. Az USDA110 jelentősen rövidebb, mint a CB1809, így a megnyúlása is kevésbé látványos. **D.** 500-500 db CB1809 bakteroid hosszának gyakorisági eloszlása üres vektorral (kék vonal), illetve a saját promóterével szabályozott *NCR169* génnel (narancssárga vonal) transzformált szójagümőből izolálva. **E.** 500-500 db CB1809 bakteroid DNS-tartalmának gyakorisági eloszlása üres vektorral (kék vonal), illetve a saját promóterével szabályozott *NCR169* génnel (narancssárga vonal) transzformált szójagümőből izolálva, SYTO 13-mal festve és áramlási citométerrel mérve. **F.** 500-500 db vad típusú és *bclA* deléciós mutáns (*ΔbclA*) USDA110 bakteroid hosszának gyakorisági eloszlása üres vektorral (kék vonal), illetve a saját promóterével szabályozott *NCR169* génnel (narancssárga vonal) transzformált szójagümőből izolálva. Eredeti ábra: Zhang és mtsai., 2023.

A saját promóterével kifejeztetett NCR169 a terminális differenciáció jeleit okozta, legnyilvánvalóbban a bakteroidok megnyúlását a szójagümő-sejtekben (19B. ábra). Az NCR169-et kifejező szójagümőből izolált bakteroidok jól láthatóan megnyúltak, és a megnőtt DNS-tartalmuk is arra utal, hogy endoreduplikálódtak. Az átalakulás nem történik meg, amennyiben a szimbiótából hiányzik a *bacA* gén ortológja, a *bclA* ($\Delta bclA$), hisz a BacA/BclA ABC-transzporter szükséges az NCR-ek bejutásához a baktériumba (19C-F. ábra). Affinitás kromatográfiával, élesztő-kettős-hibrid analízissel (Y2H) és elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálattal (EMSA) azonosítottunk két AHL (AT-Hook Motif Nuclear Localized) TF-t, melyek jelen vannak más növényekben is, tehát az NCR-ek kifejeződéséhez már meglévő TF-ok rendelődtek hozzá. *Lotus japonicus* gümőkben, ahol a szójához hasonlóan nincsenek NCR gének, *NCR169 promóter::GUS* aktivitást csak a két AHL gén jelenlétében lehetett detektálni, miközben az AHL1 vagy AHL2 gén hiánya nem befolyásolta a nitrogénkötő gümők fejlődését. Ezzel szemben *M. truncatula* esetében mind az AHL1, mind az AHL2 lecsendesítése (RNSi) Fix⁻ gümőket eredményezett és teljes mértékben megakadályozta a bakteroidok differenciálódását (Zhang és mtsai., 2023).

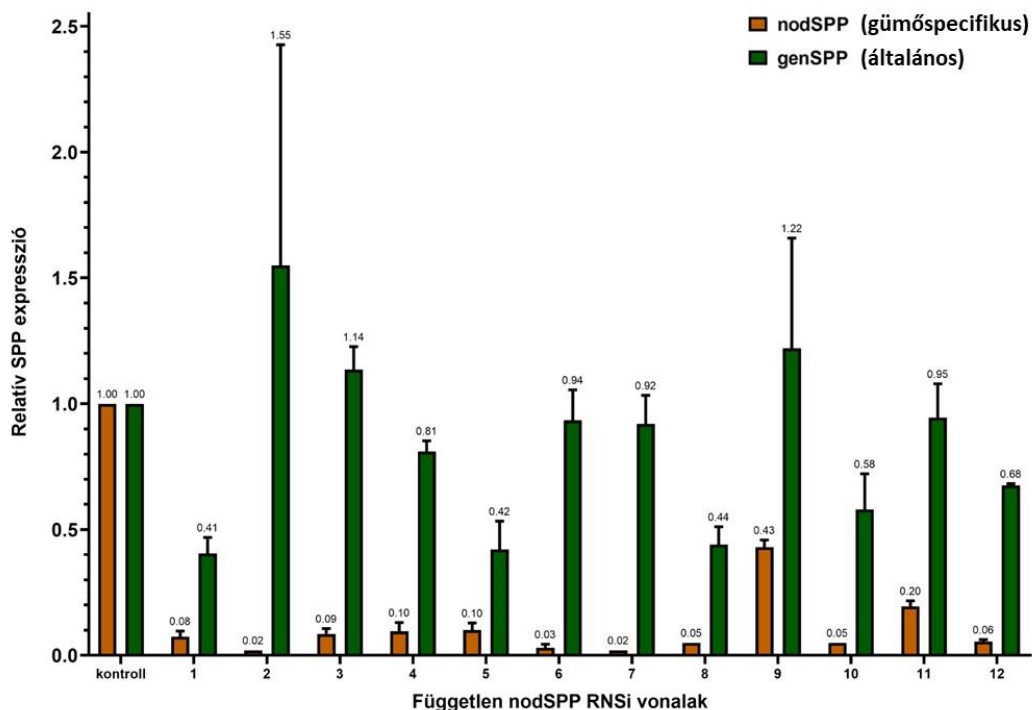
4.4 Az SPP szerepe a gümőfejlődésben

4.4.1. A gümőspecifikus szignál peptid peptidáz gén elcsendesítésével a gümő Fix⁻-á válik

Egy gén által kódolt fehérje szerepének tisztására az egyik módszer az, ha az azt kódoló gént eltávolítjuk a rendszerből vagy működésképtelenné tesszük. Erre a gén kiütése a legbiztosabb módszer, de a CRISPR/Cas technológia még nem volt ismert, amikor az RNS-interferencia (RNSi) mellett döntöttünk. Az RNSi egy eukarióta, sejtszintű szabályozó és védekező mechanizmus, ami a kettősszálú RNS-molekulákat ismeri fel. Az egyik RNS-szál beépül a RISC-komplexbe (RNS-indukálta némítókomplex), ami elhasítja az ezzel komplementer RNS-eket. A transzformáns növényekbe juttatott gümőspecifikus szignál peptid peptidáz (*nodSPP*) génszakaszt tartalmazó konstruktóról duplaszálú RNS íródott, amit az RNSi mechanizmusa felismert és elhasított, ahogy a komplementer endogén *nodSPP* mRNS-t is, ezáltal csendesítve a gént. A hairy-root tranziens transzformálás során csupán a gyökér és így az azon növe gümők transzgenikusak, de a csírán ejtett sebzésből eredő összes gyökér potenciálisan egy-egy külön transzformációs esemény eredménye, azaz a konstrukciók a genom más-más pontjába épülnek be és máshogy fejeződnek ki, így a különböző gyökereken lévő gümők egymással nem

összevethetők. Az ezután létrehozott stabil transzformánsokból származó eredmények már sokkal megbízhatóbbak, hisz itt az egész növény egy transzformáns sejtéből fejlődik ki és minden sejtje genetikailag azonos, ráadásul önbeporzás révén homozigóta növény esetében az összes utód is a transzgenre nézve azonos a szülőjével.

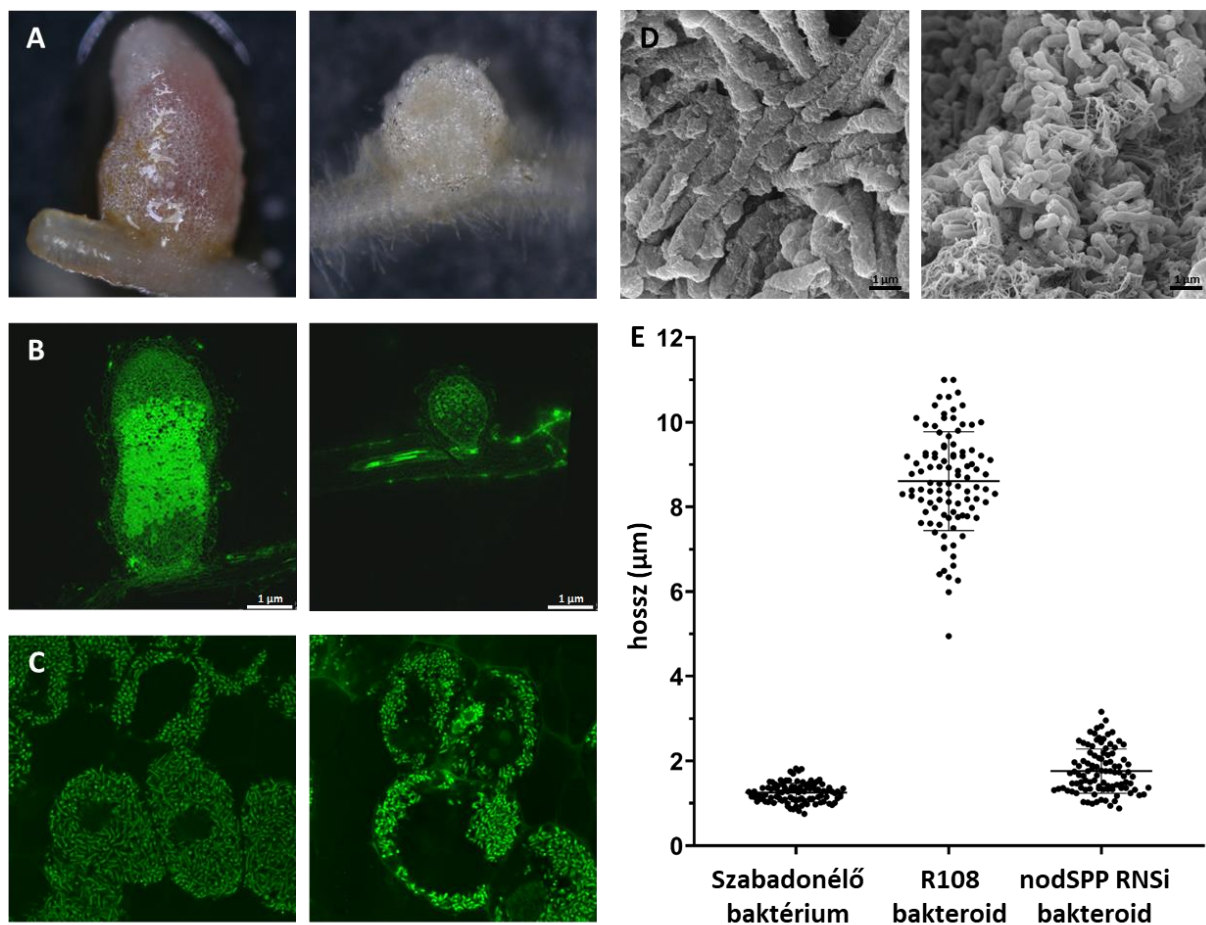
A BASTA (hatóanyaga a foszfinotricin, PPT) szelekción növő összes transzformáns növény (nulladik transzformáns generáció, T₀) hordozta a transzgent, amit a kétszálú RNS kifejezésére használt Lj ubiquitin promóterre terveztünk. Mendel törvényének megfelelően a heterozigóta T₀ szülők önbeporzásából származó T₁ utódok az RNS-interferencia domináns jellege révén 25%-a vad típusú, míg 75%-a mutáns fenotípust mutatott, ami azt is jelenti, hogy ezekben az esetekben a transzgen egy kópiában épült be a genomba. RT-qPCR-el meghatároztuk a *nodSPP* és a *genSPP* szintjét tizenkét független transzformáns vonal gumóiban (20. ábra). A legtöbb esetben a *nodSPP* szintje a kontroll R108-énak 2-10%-ára esett, míg a *genSPP* szintje nem vagy alig változott, mutatva, hogy a tervezett konstrukció specifikus volt a *nodSPP*-re. További vizsgálatokhoz a hármas vonalat választottuk, mert itt az érintett növényeken az összes gumó Fix⁻ volt és a növények egészségesek voltak, a transzgen beépülése nem okozott a gumón kívül más szervben megfigyelhető fenotipikus változásokat.



20. ábra. A *nodSPP* RNSi vonalakban a *nodSPP* mRNS szintje nagymértékben lecsökkent, míg a *genSPP* kifejeződése magas maradt.

Az mRNS szintek a *nodSPP*, illetve a *genSPP* mRNS-nek az R108 kontroll gumóban mért szintjéhez lettek normalizálva (R108-ban az érték 1). p-érték < 0,01 a *nodSPP* esetében (kivéve a kilencedik mintánál, ahol nem szignifikáns), nem szignifikáns (ns) a *genSPP* esetében (two-way ANOVA).

A nodSPP RNSi gümőkben izolált bakteroidok szignifikánsan rövidebbek voltak (2,91 μm), mint az R108 gümőkben izolált bakteroidok (8,61 μm), méretükben inkább a szabadon élő Rm41 baktériumokhoz álltak közelebb (1,25 μm), és sosem figyeltünk meg az esetükben Y-alakú formát. A nodSPP RNSi és a vad típusú R108 hosszanti gümömetseteket konfokális mikroszkóp alatt összehasonlítva nem látható különbség a ZI-ben és ZII-ben. A nodSPP RNSi IZ-ban elkezdődött a bakteroidok megnyúlása, de ez nem érte el a vad típusú gümők IZ-jában lévő bakteroidok hosszát (21. ábra). Az IZ 1-2 sejtsor vastagságú volt csak, és ebből nem fejlődött ki a ZIII, helyette egy bakteroidoktól mentes, korai szeneszcens zóna volt megfigyelhető.



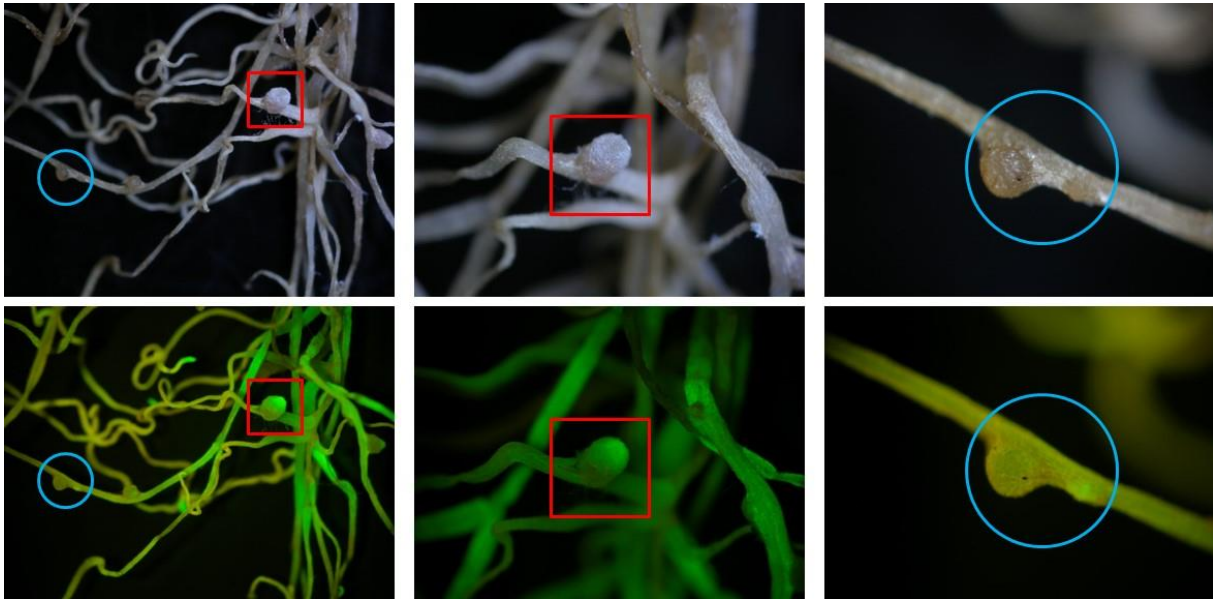
21. ábra. A nodSPP RNSi gümőben nem alakul ki a nitrogénkötő ZIII, a bakteroidok alig nyúlnak meg, szemben társaikkal a vad típusú R108 gümőkben.

A. Vad típusú R108 és nodSPP RNSi gümő sztereó mikroszkópos felvétel. **B.** R108 és nodSPP RNSi gümő, konfokális mikroszkóp, SYTO 9 festés. **C.** R108 és nodSPP RNSi gümő ZII-IZ, konfokális mikroszkóp, SYTO 9 festés. **D.** R108 és nodSPP RNSi IZ sejtekben látható bakteroidok, SEM. **E.** Szabadonélő Rm41 baktériumok, R108 gümőkben, illetve nodSPP RNSi gümőkben izolált bakteroidok hosszának összehasonlítása. A kétféle bakteroid között szignifikáns a méretkülönbség (páros t-próba, p érték < 0,0001).

4.4.2. A rizs SPP (OsSPP) komplementálja a nodSPP hiányát

Annak bizonyítására, hogy valóban a nodSPP hiánya okozza a fenotípust, komplementáltuk a mutáns növényt, azaz a hiányzó gén bevitelével vizsgáltuk, hogy visszaállítja-e a vad típusú fenotípust. A transzgenikus növény genomjába beépült RNSi konstrukció egy domináns allél, hisz egy erős promóterrel folyamatosan termeli a kettősszálú RNS-t, így a komplementálás céljából bejuttatott újabb transzgént is csendesítené. RNSi-vel lecsendesített gént úgy lehet komplementálni, ha a komplementáló konstrukció nem tartalmazza az RNSi célszekvenciát, amit például a gén nem transzlálódó régiójából (UTR) hoznak létre, így kihagyható a komplementáló konstrukcióból. A *nodSPP* két UTR-e rövid és nem specifikus, így az RNSi konstrukciót a kódoló szakaszra terveztük, ezért nem volt lehetséges a komplementálás *nodSPP*-vel. A *genSPP* nukleotid szinten 82%-ban homológ a *nodSPP*-vel (5. függelék), ezért először úgy ítéltük meg, hogy nem alkalmas a komplementálásra, de felülvizsgáltuk a véleményünket és meg fogjuk próbálni. A rizs (*Oryza sativa*) SPP (OsSPP) fehérje szinten 80%-ban, míg nukleotid szinten 70%-ban homológ az *MtnodSPP*-vel, míg az *ecetmuslica* (*Drosophila melanogaster*) SPP (DmSPP) fehérje szinten 43%-ban, míg nukleotid szinten 48%-ban homológ az *MtnodSPP*-vel. Ezt a két *SPP* gént az *MtnodSPP* promóterrel meghajtva bejuttattuk a *nodSPP* RNSi növényekbe hairy-root transzformációval.

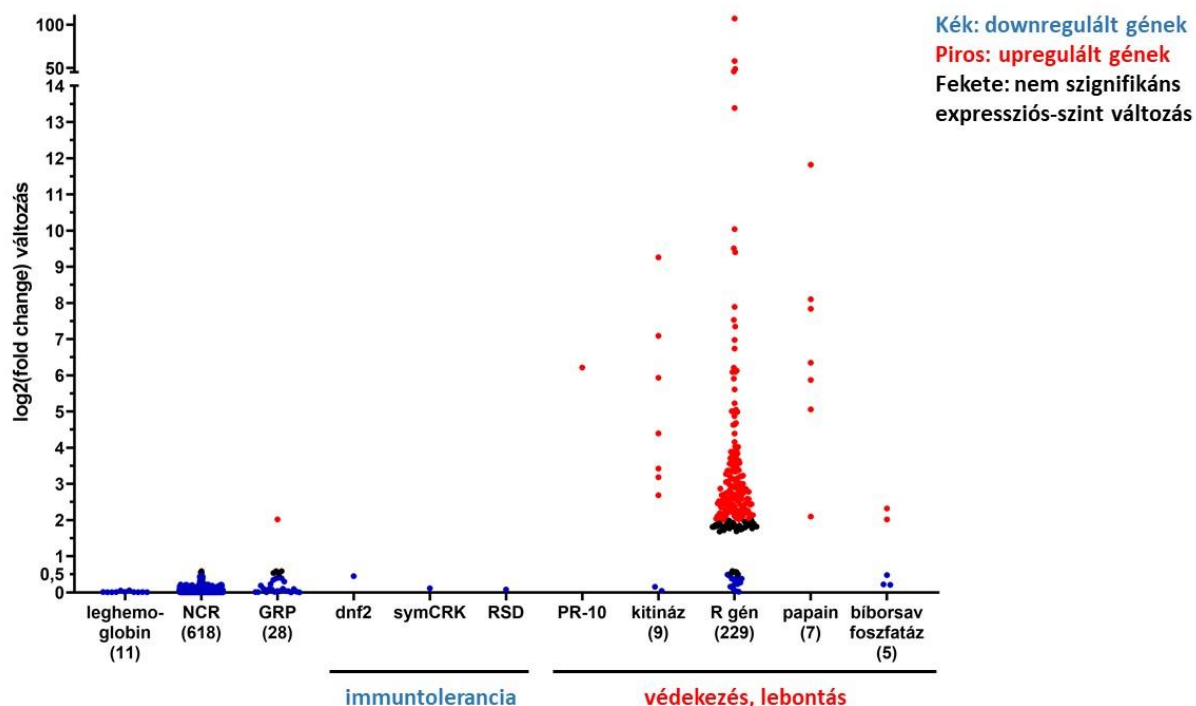
A *nodSPP* promóterrel meghajtott OsSPP sikeresen komplementálta a *nodSPP* RNSi gümőkben a natív *nodSPP* hiányát, a sikeresen transzformált, GFP-t kifejező gümők egy része rózsaszín lett, ami jelzi működőképességüket (22. ábra). A DmSPP jelenléte gátolta a gümő organogenezist, így a GFP-t kifejező sikeresen transzformált gyökereken nem nőttek gümők, csupán elvétve pár menekülő, GFP jelet nem mutató darab. Ez a hatás kisebb mértékben ugyan, de megfigyelhető volt az OsSPP esetében is, ami valószínűsíthetően a transzmembrán fehérjékkel való transzformálás technikai nehézségeinek a következménye.



22. ábra. A nodSPP RNSi növényeket komplementálta a nodSPP promóterrel szabályozott OsSPP.
Zöld: GFP jel (a sikeres transzformációt jelzi). Sárga: autofluoreszcencia. Piros keret: sikeresen komplementált gümő. Kék karika: sikertelenül komplementált gümő.

4.4.3. nodSPP RNSi gümő transzkriptom analízise

Annak megállapítására, hogy nodSPP hiányában mely gének kifejeződése változik szignifikánsan és mi vezethet ahhoz, hogy a nodSPP RNSi növények gümői Fix^- fenotípust mutatnak, teljes gümő transzkriptom-analízist végeztünk. A három R108 kontroll és három nodSPP RNSi gümő minta transzkriptom-elemzése alapján azt találtuk, hogy a nodSPP RNSi gümőkben 6280 gén mRNS-szintje változott szignifikánsan (legalább kétszeresen, p érték $< 0,05$) a kontroll, vad típusú R108 gümőhöz képest: a génexpresszió 3148 esetben nőtt (6. függelék), 3132 esetben csökkent (7. függelék). A csak gümőben, vagy a gümőben a gyökérhez képest legalább ezerszer erősebben kifejeződő (amit egy lézer mikrodisszekciós *M. truncatula* gümő-transzkriptom alapján (Roux és mtsai., 2014) állapítottunk meg) 517 gén közül 481 downregulálódik a nodSPP RNSi gümőben (93%), 20 gén upregulálódik (4%), míg 16 gén mRNS szintje nem változik szignifikánsan (3%). A szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató gének közül számos nagy jelentőséggel bír a szimbiózis során (23. ábra).



23. ábra: A nodSPP hiányában a leghemoglobin, szinte minden NCR és GRP, valamint számos immuntolerancia-gén represszált. A növény a baktériumpartneret idegenként ismeri fel és elpusztítja. Zárójelben az érintett gének száma látható. NCR: gümőspezifikus ciszteiben gazdag peptidok, GRP: gümőspezifikus glicinben gazdag fehérjék, dnf2: PI-PLC-XD-tartalmú fehérje, symCRK: szimbiotikus ciszteiben gazdag receptorszerű kináz, RSD: szimbiózisoma kialakulásának szabályozója, PR-10: patogenezishez kapcsolható fehérje 10, R gén: rezisztencia gén. $p < 0,05$.

Tizenegy leghemoglobin (Lb) génről átíródó mRNS-szintje csupán 0,7-5,7%-a volt a kontroll gümőben mért szintnek, és Lb hiányában az oxigén jelenléte működésképtelenné teszi a nitrogenáz enzimkomplexet.

Az elemzésünk során 618 *NCR* gén kifejeződését tudtuk detektálni (p érték $< 0,05$), tehát a legtöbb *NCR*-t megtaláltuk. Ezek közül 608-nak az mRNS-szintje legalább felére esett vissza a nodSPP RNSi gümőkben a vad típusú R108 gümőkhöz képest, azaz szignifikánsan csökkent expressziót mutatnak. 498 *NCR* mRNS a vad típusban mérhető szint 10%-át sem érte el, és 187 *NCR* esetében az 1%-át sem. A csökkent expressziót mutató *NCR*-ek közül részletesebben karakterizált az *NCR169* (*dnf7*, Medtr7g029760), melynek hiányában a bakteroidok differenciációja részleges, és így a gümő fejlődése sem fejeződik be (Horváth és mtsai., 2015). Az *NCR211* (*dnf4*, Medtr4g035705) hiányában a ZIII sejtek üresek vagy csupán elpusztult bakteroidokat tartalmaznak (Kim és mtsai., 2015).

A másik IRLC-specifikus géncsalád, a gümőspezifikus glicinben gazdag fehérjék (GRP) 28 tagjából 23-nak a kifejeződése szignifikánsan csökkent, míg a GRP1F (Medtr5g084100) szintje a kétszeresére nőtt.

A *dnf2* (PI-PLC-XD-tartalmú fehérje, Medtr4g085800) gátolja a gümő védelmi reakcióit és a korai szenescenciát (Berrabah és mtsai., 2015, 2014b; Gourion és mtsai., 2015), valamint szükséges a bakteroid differenciációhoz (Bourcy és mtsai., 2013). A symCRK (szimbiotikus ciszteinben gazdag receptorszerű kináz, Medtr3g079850) gátolja a gümő védelmi reakcióit, hiányában korai szenescencia alakul ki (Berrabah és mtsai., 2015, 2014b; Gourion és mtsai., 2015). Az RSD (szimbiószóma kialakulásának szabályozója, regulator of symbiosome differentiation, Medtr7g063220) egy olyan TF, ami a gümő szekréciónak szabályozásával járul hozzá a szimbiószóma fejlődéséhez, gátolja a gümő védelmi reakcióit, és közvetve befolyásolja az NCR-ek kifejeződését is (Berrabah és mtsai., 2015, 2014b; Gourion és mtsai., 2015; Sinharoy és mtsai., 2013). Mindhárom gén szükséges ahhoz, hogy a gazdanövény ne kezelje patogénként a sejtjeibe jutott rhizóbiumot.

Több, a gazdanövény védekezésében és lebontásban fontos szerepet játszó gén expressziója is megnőtt, így a PR10-nek (patogenezishez kapcsolható fehérje 10, Medtr2g035130) (van Loon és mtsai., 2006) és közel kétszáz rezisztencia génnek (R gének), valamint kitinázokat és papainokat kódoló géneknek.

4.4.4. A gümőspecifikus szignál peptid peptidáz (nodSPP): összefoglalás

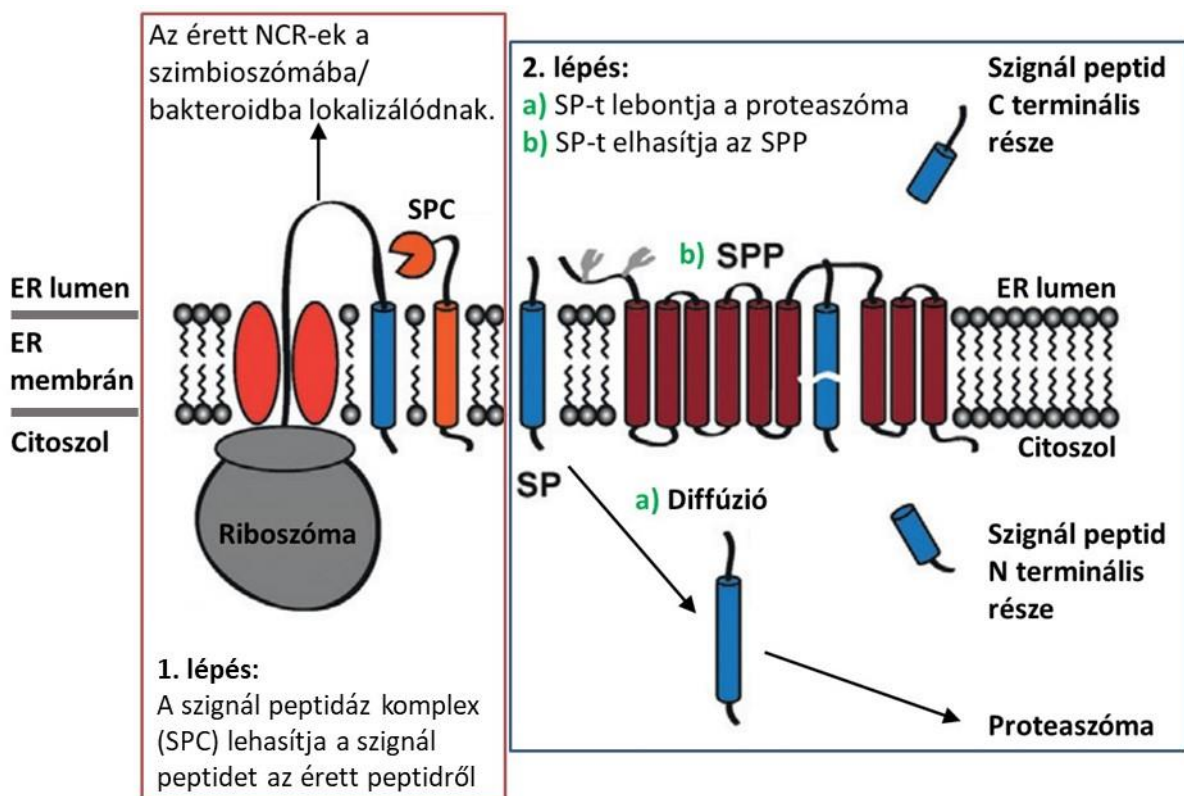
Megállapítottuk, hogy a szignál peptid peptidáz gén azokban a pillangósvirágú növénycsoportokban duplikálódott és alakult ki egy gümőspecifikus paralóg (*nodSPP*), ahol a gümőkben NCR-ek, illetve NCR-szerű peptidek termelődnek (IRLC, Dalbergioid klád). A *nodSPP* csendesítésével a gümőfejlődés leáll, benne közel ezer, szimbiózisban fontos szerepet betöltő gén csökkent expressziót mutat (leghemoglobin, *NCR*, *GRP* gének) és a szimbiótái képtelenek a nitrogén megkötésére. A *nodSPP* hiányában a gazdanövény nem ismeri fel a rhizóbiumot és elpusztítja azt.

4.5 Az NCR SP-k SPP szubsztrátok

4.5.1. A szignál peptid peptidáz (SPP)

Az SPP a GxGD aszpartil proteázok családjába tartozó enzim. A család tagjai két katalitikus aszparaginsavukkal (D) részlegesen deprotonálják és ezáltal aktiválják a vízmolekulákat,

melyek hidrolizálják a célfehérjéket. A presenilin molekulacsalád tagjai, ahová az SPP is tartozik, kilenc transzmembrán doménnel (TMD) rendelkeznek. Közülük az SPP/SPP-like (SPP/SPPL) alcsoport tagjainak az N-terminális vége a lumenben, míg a C-terminális vég a citoplazmában helyezkedik el, azaz ezek a fehérjék a névadó presenilinnel ellentétes irányban fűződnek a membránba. Az SPP/SPPL alcsoport tagjai intramembrán proteázként a membrán kettősréteg hidrofób részében az SPP/SPPL hatodik és hetedik TMD-je közé ékelődő célfehérjéket hasítják el (Brown és mtsai., 2000) (24. ábra).



24. ábra. A szignál peptid útja és a szignál peptid peptidáz szerepe az endoplazmatikus retikulumban. A transláció befejeztével az érett peptid az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenbe jut, míg a szignál peptidet (SP) levágja a szignál peptidáz komplex (SPC). Az SP ezek után vagy diffundál az ER membránból a citoszolba, ahol lebontja a proteaszóma vagy elhasítja az szignál peptid peptidáz (SPP).
Eredeti ábra: Mentrup és mtsai., 2017.

Az SPP/SPP-like (SPP/SPPL) család erősen konzervált, tagjai minden eukariótában megtalálhatóak, de különböző membránokba ékelődve: az SPP az ER-ban található (a *nodSPP* és a *genSPP* az *SPP* két paralógja *M. truncatula*-ban), míg az SPPL2a késői endoszómaokban, az SPPL2b a korai endoszómaokban, az SPPL2c szintén az ER-ban, míg az SPPL3 a Golgi-készülékben. A le nem vágódó N-terminális szignál szekvenciával rendelkező SPP a transláció után az ER lumenből a Golgi-ba jut, majd az O-glikozidos kötéssel hozzákapcsolt cukorláncok

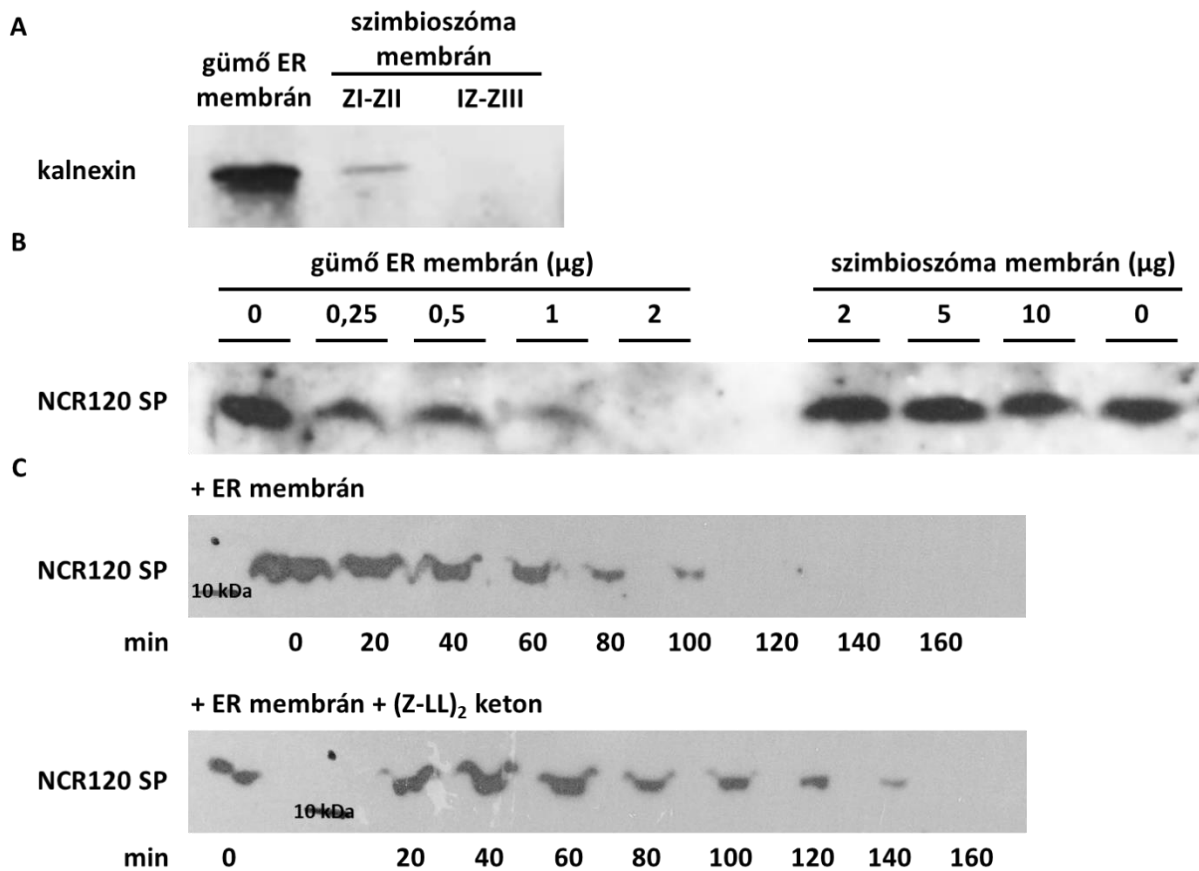
megszerzése után a C-terminális végen található KKXX retenciós szignál révén kerül vissza az ER membránba.

Az SPP-nek a nevével ellentétben nem csak SP-ek lehetnek a célpontjai (az SPPL fehérjék az SPPL2c kivételével nem is találkozhatnak SP-kkel *in vivo*), hanem olyan transzmembrán (TM) fehérjék is, melyek II-es típusú orientációban illeszkedik a membránba, azaz az N-terminális végük a citoplazmában található, míg a C-terminális végük az ER lumenben. Ilyen fehérjék a II-es, illetve a IV-es típusú TM fehérjék, melyek több TMD-je közül legalább egy II-es orientációjú. A célfehérjének egy előzetes proteolízisen is át kell esnie, hogy a TM régiója hozzáférhetővé váljon az SPP számára: ez az SP-k esetében az érett fehérje lehasítása az SPC által (Kühnle és mtsai., 2019; Voss és mtsai., 2013).

4.5.2. Az izolált ER-ben lévő SPP hasítja a szubsztrát NCR SP-eket

Az SPP aktivitás *in vitro* vizsgálatához szükségünk volt tisztított ER membránra. A tisztítást az ER membrán markerként használt, abba integrálódó kalnexin fehérje jelenlétével ellenőriztük (Neutzner és mtsai., 2011), ahogyan a szimbioszóma membrán tisztaságát is (25A. ábra), ugyanis a szimbioszóma membrán izolálás során ER membrán szennyezi a mintát, ha nem vonjuk ki előtte az ER membránt a gümő extraktumból. A két membrán egymással kapcsolatban áll, mert ugyan a szimbioszóma membrán a plazmamembránból fűződik le, de mérete folyamatosan nő a bakteroidok megnyúlásával párhuzamosan és ezt a méretnövekedést a poszt-Golgi vezikulák (amik az NCR-eket is szállítják) mellett az ER membrán is táplálja (Gavrin és mtsai., 2017). Az SPP szubsztrátnak vélt NCR120 SP-t a vad típusú gümőkől tisztított ER membrán koncentrációtól függően hasította, míg az ugyanabból a gümőkől kivont szimbioszóma membrán erre nem volt képes még ötször nagyobb koncentrációban sem (25B. ábra). Csírából tisztított ER is képes az NCR120 SP hasítására, ami alapján a genSPP és a nodSPP döntően a szövet- és sejtspecifikus kifejeződésében mutat különbséget, míg enzimaktivitásukban, szubsztrátspecifitásukban nem. Amikor húsz percenként vettünk mintát az emésztésből, akkor vált láthatóvá, hogy a csíra ER membrán már 120 perc után teljesen elbontja az NCR120 SP-t, míg az SPP-specifikus gátlószer (Z-LL)₂ keton (a *h*-régiónak utánzó kompetitív inhibitor) jelenlétében a peptid csak 160 perc kezelés után tűnik el, azaz az életideje közel 50%-al megnőtt. Ezen eredmények értelmében az ER membrán aktivitása, melyet az SPP-nek tulajdonítunk, valóban csak az ER membránra jellemző, ahol az SPP található, míg a szimbioszóma membránra nem, ahol nincs SPP. Az ER membrán aktivitását gátolja az SPP-

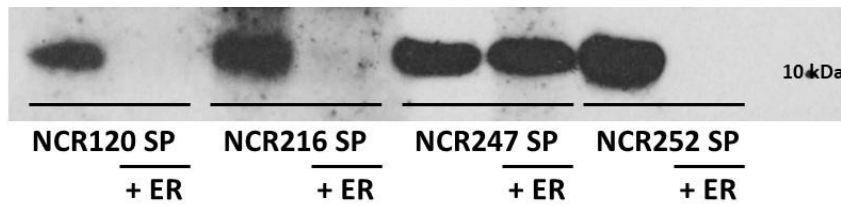
specifikus gátlószer, így bizonyítva, hogy a szignál peptidet valóban az SPP bontja le (25C. ábra).



25. ábra: Az ER membrán SPP aktivitása szükséges a szignál peptidek hasításához

A: Az ER-specifikus kalnexin kimutatása *M. truncatula* gümőből tisztított ER membránban és szimbioszóma membránban Western blottal. **B:** SPP-célpontnak prediktált, HA-taggal jelölt NCR120 SP inkubálása különböző mennyiségű ER membránnal és szimbioszóma membránnal. **C:** SPP-célpontnak prediktált, HA-taggal jelölt NCR120 SP inkubálása ER membránnal és az SPP-specifikus inhibitor (Z-LL)₂ keton hiányában, illetve jelenlétében. **B, C:** A western blot HA-specifikus elsődleges ellenanyaggal történt.

Az *M. truncatula* csírából tisztított ER-ban lévő SPP szubsztrátként fogadta el az SPP szubsztrátnak vélt szignál peptideket, így az NCR120 SP-t, amely két szerint tartalmaz a *h*-régiójában, valamint az NCR216 SP-t és NCR252 SP-t, amelyek egy-egy ciszteint tartalmaznak a *h*-régiójukban, míg *h*-régiójában hélix-törő aminosavat nem tartalmazó, tehát nem SPP szubsztrát NCR247 SP érintetlen maradt (26. ábra).



SPP szubsztrát

NCR120 SP **MAK****FV****NFVY****S**MIIFL**S**LLV**A**
h-régio

NCR216 SP **MTTILK****FAYVMII****C**LFL**LQVAA**
h-régio

NCR252 SP **MNIIFK****C**VY**HMIVILL**LLLV**ATEA**
h-régio

nem SPP szubsztrát

NCR247 SP **MDKI****HKFIYALIF****FLALFLVV**NA
h-régio

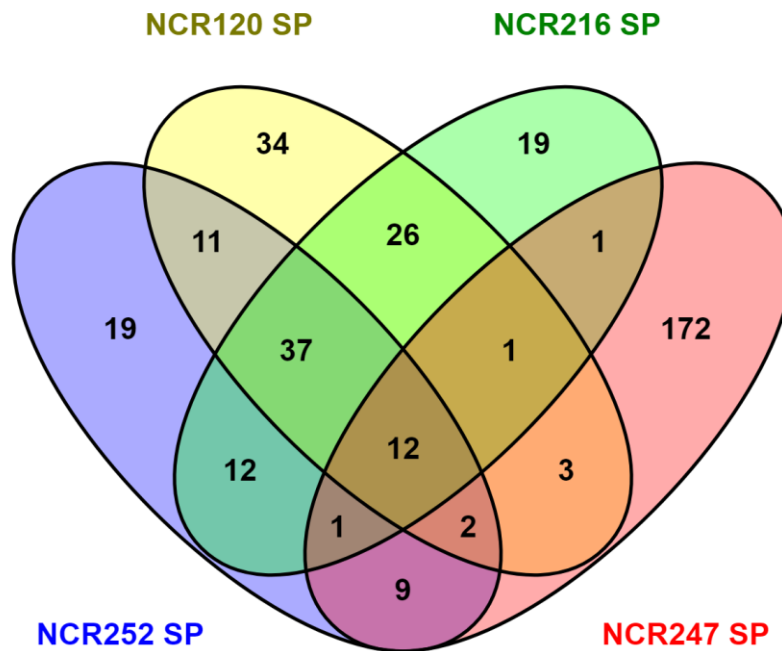
26. ábra: Az ER membránban lévő SPP hasítja az SPP szubsztrátnak vélt SP-eket, míg az NCR247 SP-et, aminek *h*-régijában nincsen hélix-törő aminosav, nem.

SPP szubsztrátok: NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP. Nem SPP szubsztrát: NCR247 SP. *h*-régio: Az ER membránba illeszkedő, nagyoobrrészt hidrofób aminosavak. Piros: hidrofób aminosavak (A, C, F, G, I, L, M, P, V, W, Y), fekete: hidrofil aminosavak (D, E, H, K, N, Q, R, S, T). Aláhúzott: hélix-törő vagy destabilizáló aminosav. A szintetikus SP-k HA-taggal jelöltek, a western blot HA-specifikus elsődleges ellenanyaggal történt.

4.5.3. Az NCR szignál peptidek fehérje kölcsönhatásának vizsgálata: az SPP szubsztrát és nem-szubsztrát SP-k más fehérjéket kötnek

Bár az SP-ek szerepe a fehérjék ER-ba való irányítása, nem kizárt, hogy más szerepük is lehet. Például a preprolaktin SP N-terminális része SPP hasítás után a kalmodulin fehérjéhez kötődve visszacsatolási jelként működik a preprolaktin termelés számára (Martoglio és mtsai., 1997). Ehhez hasonlóan a HIV-1 vírus p-gp160 burokfehérje SP N-terminális része SPP hasítás után kötődik a gazdasejt kalmodulinjához (Martoglio és mtsai., 1997). Annak érdekében, hogy azonosítsuk az NCR SP-k lehetséges kölcsönható fehérjepartnereit, négy különböző szintetikus HA-tag-gel jelölt NCR SP-vel és *M. truncatula* A17 gümőkivonattal végeztünk affinitás kromatográfiát (pull-down analízist a HA-tag kötésével), majd a SP-ekhez kötött fehérjéket tömegspektrométerrel azonosítottuk. Miután eltávolítottuk azokat a találatokat, melyeket a HA-tag önmagában is kifogott, 359 *M. truncatula* fehérjét azonosítottunk legalább 2 peptid találattal (peptide count) (8. függelék). A három SPP-célpont (NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP) pull-down analízisében összesen 187 fehérjét találtunk, melyek közül 37 fehérje (20%) mind a három NCR SP-el kölcsönhatott. Az NCR247 SP, amit pedig nem hasít az SPP, pull-down

analízis során 172 olyan fehérjéhez kapcsolódott, ami a másik 3 NCR SP egyikénél sem bukkant fel, ami az összes NCR247 SP találat 86%-a (27. ábra).



27. ábra: A szintetikus NCR SP-k lehetséges kölcsönható partnereinek száma affinitás kromatográfia alapján.

SPP szubsztrátok: NCR120 SP (sárga), NCR216 SP (zöld), NCR252 SP (kék). Nem SPP szubsztrát: NCR247 SP (piros).

A három SPP szubsztrát NCR SP esetében több sejtmagban kódolt, de a mitokondriumba lokalizálódó fehérjét azonosítottunk, így a malonil koenzim A-acil-karrier transzacyláz (malonyl CoA-acyl carrier transacylase: G7J0N6), ami koenzim A-t termel a zsírsav anyagcsere során, a piruvát dehidrogenáz E1 alegységét (PDH E1: G7K5M8, G7LEP9), a piruvát-dekarboxiláz, ami a piruvátot és a koenzim A-t alakítja acetil-koenzim A-vá a mitokondrium mátrixában, és a mitokondriális fissziós fehérjét (Mitochondrial fission 1 protein: B7FH42), ami a mitokondriumok számának szabályzásában vesz részt (Arimura, 2018).

A legmagasabb peptid-számmal jellemezhető nem SPP szubsztrát NCR247 SP-specifikus találatok közül kiemelkedik két darab I-es típusú keményítő elágaztató enzim (starch branching enzyme I, SBE I: A0A072U332, A0A072V2Q9) és a plasztid transzketoláz (plasztid transketolase: G7IF28), melyek az amiloplaszt és a benne tárolt keményítő felépítésében

vesznek részt (Tetlow és Emes, 2014). Alacsony peptid-találattal a nodSPP (A0A072VCH8) is a kölcsönható partnerek közt volt.

Az NCR247 SP 172 specifikus partnere közt található a gümőspezifikus kalmodulin-szerű CaML1 (Q8LKW8/Medtr3g055570) fehérje, ami SP-je révén a szimbioszómába lokalizálódik (Liu és mtsai., 2006), továbbá egy kalmodulin-domén kináz CDPK protein (G7JJ67) és két EF-kéz kalciumkötő fehérje (B7FNA2, G7L1W8), mely fehérjecsaldába a kalmodulin is tartozik.

Az érett peptidről levágott SP-eket az ER-ból való kikerülésük után a proteaszóma emésztí fel (Martoglio és Dobberstein, 1998), de úgy tűnik- a kétfajta NCR SP más-más útvonalra terelődik. Az NCR120 SP, az NCR216 SP és az NCR252 SP partnerei közt a proteaszóma elemeit találtuk meg (G7IJ13, G7J5I9, G7L5K7), míg az NCR247 SP-nél a COP9 szignalszóma komplex tagjait (A0A072TQ51, A0A072U145, G7JDJ7, I3T146).

4.5.4. Az NCR szignál peptidek: összefoglalás

Közel kétezer IRLC NCR SP aminosav-szekvencia összehasonlításával megállapítottuk, hogy az NCR SP-ek konzerváltak, annak ellenére, hogy nagy általánosságban a SP-ek evolúciója gyorsabb, mint az érett fehérjéé. Az NCR SP-ek jelentős részénél az ER membránba ágyazódó hidrofób *h*-régióban konzervált pozícióban található egy hélix-törő szerin, ami ezeket a SP-eket lehetséges szignál peptid peptidáz (SPP) szubsztráttá teszi. Az NCR120 SP, az NCR216 SP és az NCR252 SP *h*-régiója tartalmaz hélix-törő aminosavakat (szerint vagy ciszteint) és ennek megfelelően az SPP-t tartalmazó ER membrán *in vitro* elhasította őket. Az NCR247 SP *h*-régiója nem tartalmaz hélix törő aminosavat és az ER membránban lévő SPP nem hasította el. A négy SP-del és *M. truncatula* gümő extraktummal affinitás kromatográfiát végezve a kölcsönható fehérjepartnerek két csoportba rendeződtek aszerint, hogy az SP SPP szubsztrát-e vagy sem. Az SPP szubsztrát SP-ek esetében a kölcsönható partnerek mitokondriális fehérjék és a proteaszóma komplex elemei voltak, míg a nem SPP szubsztrát NCR247 SP esetében amiloplasztisz-fehérjék, kalmodulinok, a COP9 szignalszóma komplex elemei és a nodSPP. Az eredmények alapján lehetséges, hogy a nem SPP szubsztrát NCR SP-ek a nodSPP-hoz kötődve, annak nem proteolitikus funkciója révén jelátviteli útvonalakat befolyásolnak, visszacsatolási jelként szolgálva a megfelelő gümőfejlődéshez és szimbiózishoz.

4.6. Az NCR-ek antimikrobiális hatása

A kationos NCR-ek közül néhánynak, így például az NCR247-nek és az NCR335-nek ismert a baktérium- és gombaölő képessége, ezért feltételeztük, hogy más NCR-eknek is lehet antimikrobiális hatása. Ráadásul az NCR-ek nagyon különbözőek (aminosav-sorrend, fizikokémiai tulajdonságok), ami alapján a hatásuk és specifitásuk is eltérhet egymástól. Évente öt millió ember hal meg mikrobiális fertőzésekben, ezért az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) rendkívüli módon sürgeti innovatív, új antimikrobiális ágensek kifejlesztését, különösen a WHO kiemelten fontos listjában szereplő baktériumokkal és gombákkal szemben (Murray és mtsai., 2022). Ennek megfelelően kémiai szintézissel előállított NCR peptidek és NCR peptid származékok antimikrobiális aktivitását vizsgáltuk emberi kórokozó baktériumokon, köztük multirezisztens ESKAPE törzseken, és a *Candida albicans* gombán.

4.6.1 Az NCR-ek antimikrobiális hatása humán patogén baktériumokkal szemben

Az NCR peptidek emberi kórokozókra gyakorolt hatásának megismerése céljából 78 *M. truncatula* NCR-t (MtNCR), 12 nem-Mt IRLC (*Pisum sativum*, *Galega orientalis*, *Cicer arietinum*, *Medicago sativa*) NCR-t és ezek 8 származékát teszteltük ESKAPE patogéneken (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*), továbbá *Listeria monocytogenes*-en és *Salmonella enteritidis* fajokon (1. táblázat).

Az MtNCR peptidek kiválasztásánál figyelembe vettük több fizikokémiai tulajdonságukat is, úgymint az izoelektromos pontjukat (pI: 2,95 és 10,69 között) és a nettó töltést (NC: -10,2 és 7,8 között), amelyek közül 50 peptid hétnél nagyobb pI értékkel és pozitív nettó töltéssel, míg 28 peptid hétnél kisebb pI értékkel és negatív nettó töltéssel rendelkezett. A többi kiválasztott IRLC NCR és NCR-származék mind erősen kationos jellegű (pI > 9,5, pozitív nettó töltés) volt.

mutatnak egymással (~67% fehérje szinten, az első és utolsó konzervált cisztein között), valószínűsíthetően egy új keletű génduplikáció eredményeképpen, és hasonló tulajdonságok jellemzik őket (pI: 8,37, NC: 3,7 és 3,8), ennek ellenére az aktivitásuk teljesen eltérő. NCR377 és NCR645 az *E. faecalis* kivételével az összes kórokozót elpusztította, míg NCR280 és NCR700 az *E. faecalis* és *S. aureus* ellen, NCR055 a *K. pneumoniae* és *S. aureus* ellen, NCR384 az *E. faecalis* és *K. pneumoniae* ellen nem volt hatékony csupán. NCR183 öt patogén törzset pusztított el, míg NCR299, NCR471 és NCR520 négyet, NCR135 hármat, NCR281, NCR350 és NCR649 kettőt, NCR030, NCR032 és NCR035 egyet. Egy tesztelt anionos NCR sem volt hatékony 25 µM-os koncentráció mellett sem, míg a neutrálisak közül csupán egy, NCR147 mutatott aktivitást *A. baumannii*, *E. coli*, *L. monocytogenes* és *P. aeruginosa* ellen.

A teljes hosszúságú IRLC NCR-ek mindegyike (CaNCR13, CaNCR63, MsNCR443, MsNCR463, PsNCR349, PsNCR352) aktív volt egy vagy több kórokozó ellen az MsNCR463-at leszámítva, ami csupán *P. aeruginosa* ellen mutatott gyenge aktivitást (MBC: 25 µM). Az MsNCR463 relatív hatástalanságát az N-terminális rész adhatja, elsősorban az itt található nagy mennyiségű negatív töltésű aminosav (D) miatt, míg a pozitívan töltött aminosavak (K, R) a molekula C-terminális részén található meg, ezért két rövidebb, C-terminális eredetű származékot is szintetizáltunk, az MsNCR463₁₆₋₃₅-öt és az MsNCR463₁₇₋₃₀-at. Ehhez hasonlóan, a PsNCR349 C-terminális részén található kilenc lizin (K) lehet legnagyobbbrészt felelős az NCR antimikrobiális aktivitásáért, így ebben az esetben is teszteltünk két rövidebb darabot, a PsNCR349₂₆₋₅₀-öt és a PsNCR349₃₁₋₅₀-et. CaNCR63 esetében a pozitívan töltött aminosavak egyenletesen oszlanak el a teljes molekula hosszában, így itt nagyjából kettévágtuk az NCR-et egy N-terminális részt (CaNCR63₁₋₂₀) és egy C-terminális részt (CaNCR63₁₅₋₃₄) hozva létre.

A *C. arietinum*, *M. sativa*, *P. sativum* öt kationos NCR peptidjének (CaNCR13, CaNCR63, MsNCR443, PsNCR349, PsNCR352), valamint azok hat származékának (CaNCR63₁₋₂₀, CaNCR63₁₅₋₃₄, MsNCR463₁₆₋₃₅, MsNCR463₁₇₋₃₀, PsNCR349₂₆₋₅₀, PsNCR349₃₁₋₅₀) a hatását ellenőriztük az ESKAPE baktérium *A. baumannii*-n és az élesztőgomba *C. albicans*-on. (2. táblázat).

Név	Aminosav-szekvencia	pI	NC	MBC	MFC
CaNCR13	KPCQSDKDCKKFKACRKPVKPKINGFCCKVRIW-COOH	9,93	7,6	6,25	6,25
CaNCR63	KMICKTRVDCKKYRCPRSKI-KDCVKGRCVRKK-COOH	10,48	11,6	6,25	3,125
CaNCR63 ₁₋₂₀	KMICKTRVDCKKYRCPRSKI-CONH ₂	10,85	7,8	6,25	25
CaNCR63 ₁₅₋₃₄	CPRSKI-KDCVKGRCVRKK-CONH ₂	10,65	7,7	6,25	3,125
MsNCR443	ESIECRTVADCPKLISSKFVIKCIKRCVAQFFK-COOH	9,68	4,7	6,25	6,25
MsNCR463 ₁₆₋₃₅	CKPKRGVNFRCRKGKCFVVR-CONH ₂	11,79	8,8	1,6	3,125
MsNCR463 ₁₇₋₃₀	KPKRGVNFRCRKGK-CONH ₂	12,45	7,9	3,125	3,125
PsNCR349	YNLYCTNDKDCPTMMCFPPDVSKCVWKT-CYCVQKHKKLKKKKLTFNM-COOH	9,93	9,7	3,125	3,125
PsNCR349 ₂₆₋₅₀	VWKT-CYCVQKHKKLKKKKLTFNM-CONH ₂	11,06	11	3,125	3,125
PsNCR349 ₃₁₋₅₀	YCVQKHKKLKKKKLTFNM-CONH ₂	11,24	10	6,25	1,6
PsNCR352	PSGLRCLNDSCLRFRCISKIYKVLCIERRCRRIKMH-COOH	10,3	6,8	6,25	3,125
Ampicillin				10240	
Mikonazol					50580

2. táblázat: NCR-ek antimikrobiális aktivitása *A. baumannii* és *C. albicans* ellen.

pI: izoelektromos pont. NC: nettó töltés (net charge). MBC/MFC: minimális gátló koncentráció (minimális baktericid koncentráció vagy minimális fungicid koncentráció), µM-ban.

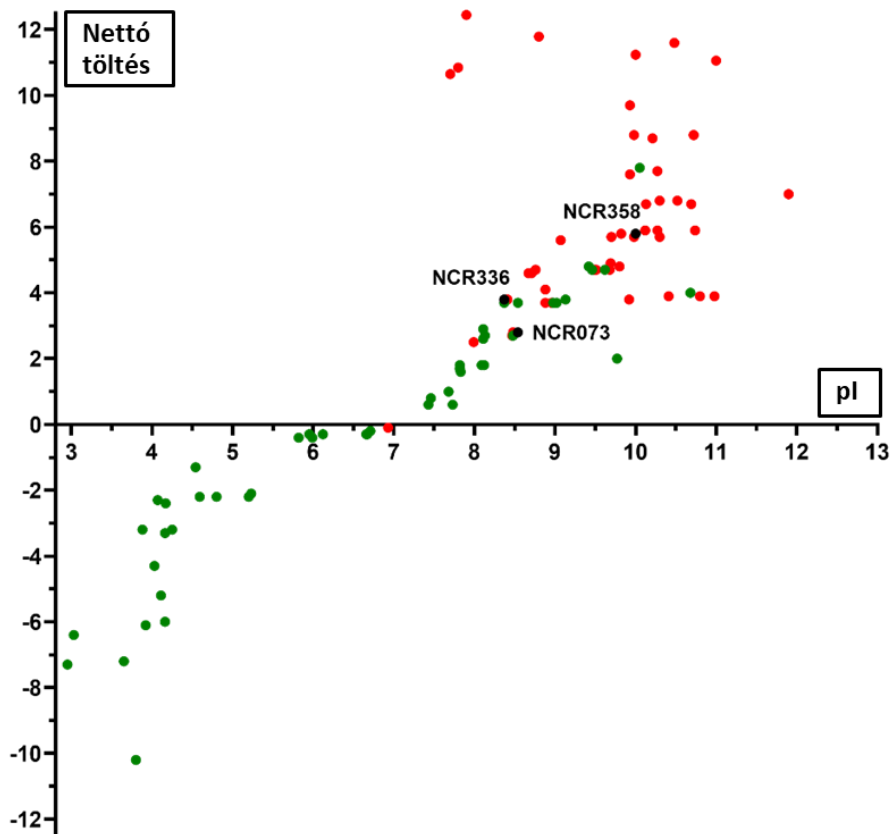
A karbapenem-rezisztens *A. baumannii* egyre jelentősebb egészségügyi problémát jelent, hisz ez a kórokozó még nagyobb sebességgel terjed, mint a többi ESKAPE baktérium, és ellenálló a karbapenem antibiotikumokkal szemben, melyeket toxicitásuk miatt „végső megoldás”-ként használnak olyan bakteriális fertőzések esetében, amelyek ellen más szer már nem használ (Harding és mtsai., 2018; Kyriakidis és mtsai., 2021). A baktériumokhoz hasonlóan a multidrog-rezisztens *Candida* törzsek is nagy mértékben elterjedtek, és forrásai a kórházi fertőzéseknek elsősorban császármetszés, szervtranszplantáció és rákkezelés esetében (Fernando és mtsai., 2017).

Mindegyik peptid hatékony volt mind *A. baumannii* (MBC: 1,6 – 6,25 µM között), mind *C. albicans* (MFC: 1,6 – 25 µM között) ellen, de a legaktívabb az MsNCR463 két C-terminális származéka, az MsNCR463₁₆₋₃₅ és az MsNCR463₁₇₋₃₀ volt (MBC: 1,6 és 3,1 µM, MFC: 3,1 µM), melyeknek a legmagasabb a pI értékük a tesztelt molekulák között (11,79 és 12,44). A PsNCR349-nek és C-terminális származékának, PsNCR349₂₆₋₅₀-nek az MBC és MFC értéke is megegyezett (3,125 µM), míg a még rövidebb fragment, a PsNCR349₃₁₋₅₀ aktivitása csökkent *A. baumannii* ellen (MBC: 6,25 µM), de a *C. albicans* ellen ez volt a leghatékonyabb peptid (MFC: 1,6 µM). A többi peptid (CaNCR13, CaNCR63, CaNCR63₁₋₂₀, CaNCR63₁₅₋₃₄, MsNCR443, PsNCR349₃₁₋₅₀, PsNCR352) MBC értéke egybehangzóan 6,25 µM volt.

A kórokozók közül az *E. faecalis* volt a legellenállóbb az NCR-ekkel szemben, hisz csupán kilenc peptid (NCR055, NCR073, NCR183, NCR299, NCR336, NCR358, NCR520, GoNCR308, PsNCR351) volt képes elpusztítani ezt a Gram pozitív baktériumot. *K. pneumoniae* érzékeny volt 13, *S. aureus* 18, *S. enterica* 21, *L. monocytogenes* 24, *A. baumannii* 27, *E. coli* 33, míg *P. aeruginosa* 36 NCR-rel szemben.

4.6.2. Az NCR-ek antimikrobiális hatásmechanizmusát befolyásoló fizikokémiai tulajdonságok

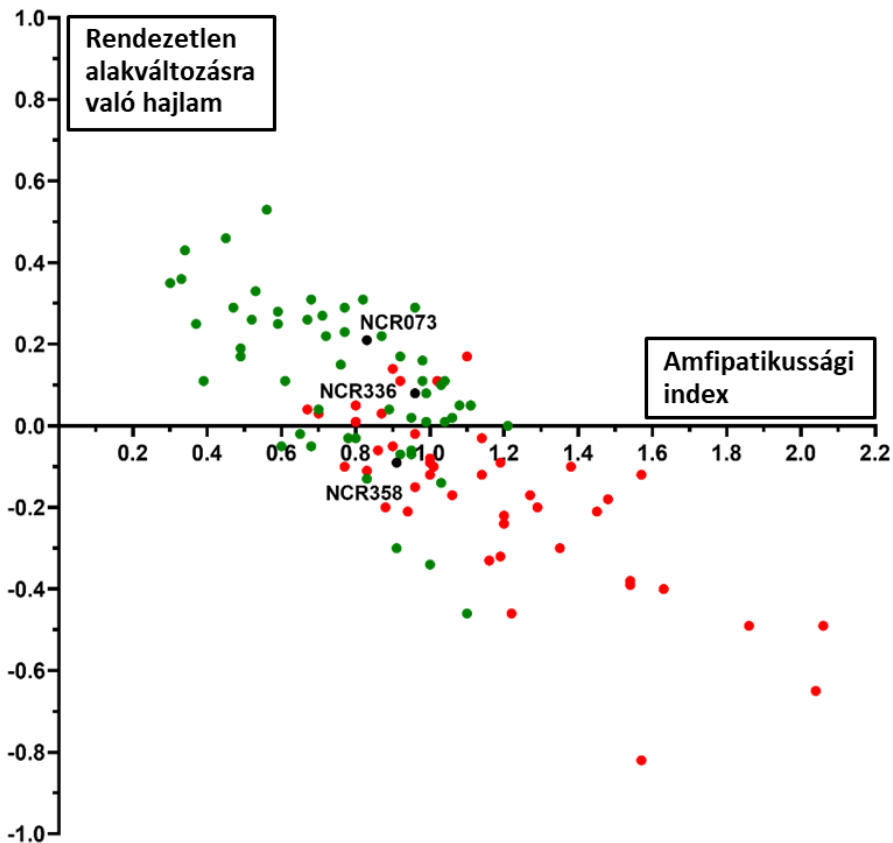
Az aktív és inaktív NCR-ek számos, a DBAASP v3 (Pirtsckhalava és mtsai., 2021) predikációs program segítségével kiszámított fizikokémiai tulajdonsága közül a nettó töltés, a pI, a rendezetlen szerkezetre való hajlam, valamint az amfipatikussági index határozza meg az NCR-ek antimikrobiális hatását (28. és 29. ábra).



28. ábra: Az NCR peptidek antimikrobiális aktivitása pozitív nettó töltést és kationos pI-t igényel. .

A 104 NCR peptid eltérő antimikrobiális aktivitását különböző színek jelölik: zöld: nem aktív, piros: legalább egy baktériummal szemben aktív, fekete: mind a nyolc baktériummal szemben aktív (NCR073, NCR336, NCR358). pI: izoelektromos pont.

Az antimikrobiálisan aktív NCR-ek pozitívan töltöttek, kationosak és rendezetlen szerkezetűek, de kevésbé hidrofóbak és inkább amfipatikusak, mint az inaktív peptidek. A nettó töltés és a pI fontos meghatározói az NCR-ek antimikrobiális hatásának, de nem az egyedüliek, hisz több kifejezetten magas NC és pI értékkel rendelkező NCR is hatástalannak bizonyult mind a nyolc patogénnel szemben (például az NCR192). A legalább 2 nettó töltésű NCR-ek nagy része antimikrobiális, de 5 fölött mindegyik az, az egyetlen kivétel NCR192-öt leszámítva.



29. ábra: Az NCR peptidok antimikrobiális aktivitása összefüggést mutat az amfipatikussági indexszel és a rendezetlen alakváltozásra való hajlammal.

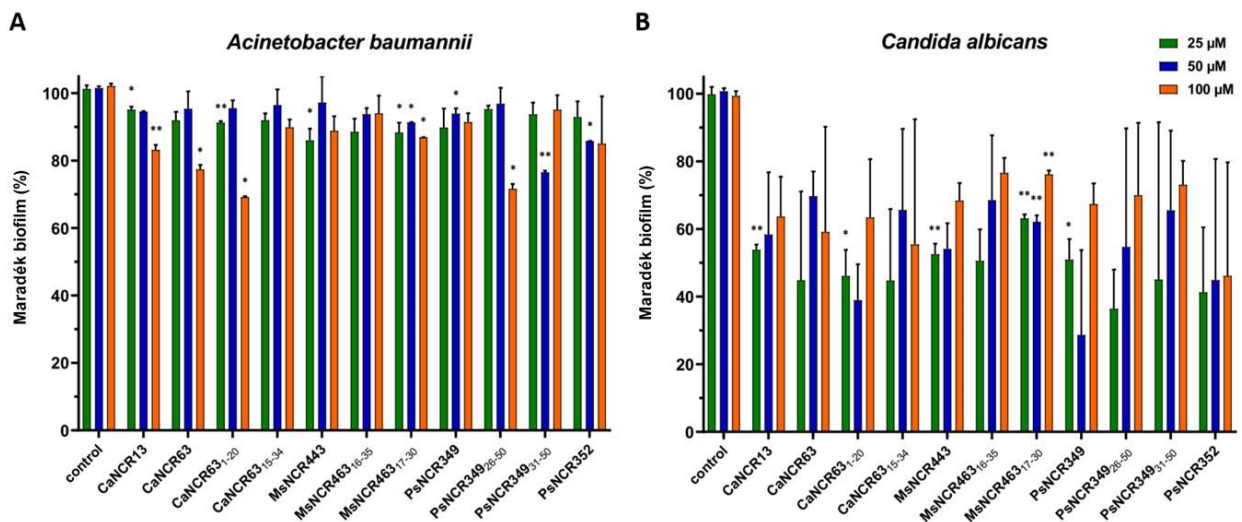
A 104 NCR peptid eltérő antimikrobiális aktivitását különböző színek jelölik: zöld: nem aktív, piros: legalább egy baktériummal szemben aktív, fekete: mind a nyolc baktériummal szemben aktív (NCR073, NCR336, NCR358). pI: izoelektromos pont.

A rendezetlen szerkezet és magasabb amfipatikusság révén (29. ábra) a peptidok nagyobb valószínűséggel vesznek fel másodlagos szerkezetet a membrán-víz határfelületen, ami szintén kedvez az antimikrobiális aktivitásnak (Pirskhalava és mtsai., 2021; Vishnepolsky és Pirskhalava, 2014).

Habár az aktív NCR336 és az inaktív NCR284 között magas a homológia, egyezik az NC értékük és szinte azonos a pI értékük (0,04 eltérés), az NCR336 szerkezete rendezetlenebb, erősebben amfipatikus és inkább hidrofób, ami magyarázhatja az aktivitásbeli különbséget. Az inaktív NCR011 kevésbé rendezetlen, mint a hozzá hasonló nettó töltésű és pI értékű, de nagyon aktív NCR073. A magas nettó töltésű és erősen kationos NCR192 hidrofilitása eredményezheti a molekula inaktivitását. Hasonló pI, nettó töltés és fizikokémiai tulajdonságok ellenére egyes peptidok aktívak, míg mások inaktívak, mutatva, hogy az aminosav-sorrend szintén rendkívül fontos tényező.

4.6.3. Az IRLC NCR peptidek képesek a *C. albicans* biofilm lebontására

A biofilm védőhatásának köszönhetően az abban található mikroorganizmusok kevésbé hozzáférhetőek az antimikrobiális peptidek (AMP) számára, ezzel fokozva a patogének ellenállóképességét. A hosszan tartó, illetve visszatérő fertőzéseknél kiemelkedően fontos a biofilm szerepe, a biofilm képződés a kórházi fertőzések kétharmadánál jelentkezik, ezért ellenőriztük, hogy az NCR-ek képesek-e lebontani már kialakult biofilmeket. *A. baumannii* és *C. albicans* 48 óra alatt kialakult biofilmjét inkubáltuk 24 órán keresztül 25, 50 vagy 100 μM szintetikus NCR jelenlétében, majd a biofilmek mennyiségét hasonlítottuk a kontrollhoz (0 μM NCR). Az *A. baumannii* tartósabb, ellenállóbb biofilmet hoz létre, mint a *C. albicans*, és ennek megfelelően a vizsgált NCR-ek csak kismértékben voltak képesek lebontani a baktérium által alkotott mátrixot, kivéve a legnagyobb, 100 μM -os koncentráció esetében (30A. ábra). Ellenben az összes IRLC NCR jelentős mértékben, akár 70%-al is csökkentette a *C. albicans* biofilm mennyiségét, habár sok esetben annyira szórt az eredmény, hogy nem mind lett szignifikáns az egyszempontos varianciaanalízis (one-way ANOVA) alapján (30B. ábra). Érdekes, hogy *C. albicans*-nál sok esetben az NCR-eknek a biofilmre gyakorolt hatása a peptid mennyiségével fordított arányban növekedett.

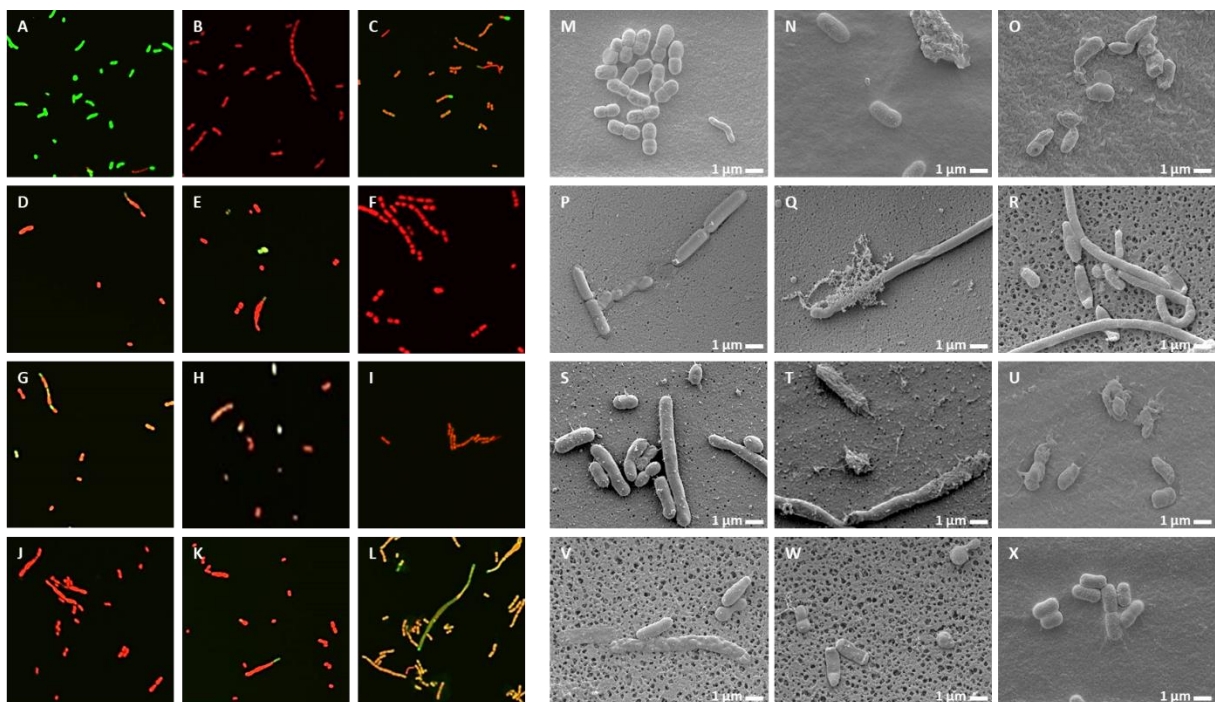


30. ábra: IRLC NCR peptid származékok hatása *A. baumannii* és *C. albicans* biofilmekre. - *A. baumannii* biofilmek bontása kevésbé volt hatékony, szemben a *C. albicans* biofilmek hatékony bontásával.

Tizenegy IRLC NCR-t és NCR származékot teszteltünk 25, 50 és 100 μM koncentrációban már kialakult **A. A. baumannii** és **B. C. albicans** biofilm ellen. Az ábrák a tapasztalati szórást mutatják (standard deviation, SD). *, ha a p-érték < 0,05 és **, ha a p-érték < 0,01 az egyszempontos varianciaanalízis (one-way ANOVA) alapján.

4.6.4. Az IRLC NCR-ek membrán átjárhatóságot, morfológiai változást és sejthalált okoznak *A. baumannii*-nál és *C. albicans*-nál

Az NCR-ek által okozott lehetséges membrán-károsodást élő/halott festéssel (live/dead staining) vizsgáltuk (31A-L. és 32A-L. ábra). A membrán-permeábilis SYTO 9, ami kék fényvel megvilágítva zölden fluoreszkál, minden sejtbe képes bejutni, míg a propídium-jodid (PI), ami zöld fényvel megvilágítva piros színben fluoreszkál, csak a sérült membránon képes áthatolni, ezzel jelezve hogy az általa megfestett sejt elpusztult (Robertson és mtsai., 2019). Az NCR-kezelés után rögtön hozzáadtuk a festéket a mintákhoz és megvizsgáltuk őket konfokális mikroszkóppal, így elmondható, hogy legtöbb esetben pillanatokkal az NCR hozzáadása után elpusztultak a sejtek (a PI sejten belüli megjelenését figyelhettük meg, ami a gyorsaság és az MBC-közeli NCR-kezelés mellett a mikrobák pusztulására utal), amit a kezelt sejtek SEM-el megfigyelt morfológiája is alátámasztott (31M-X. és 32M-X. ábra).



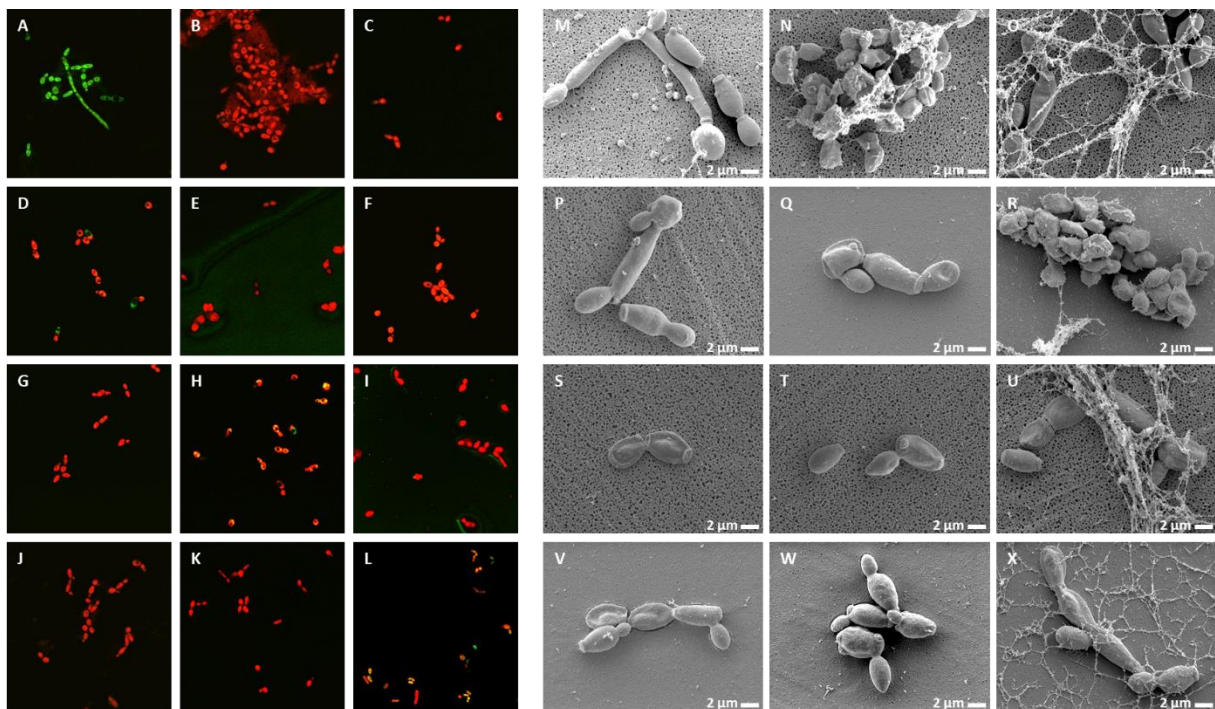
31. ábra: *A. baumannii* sejtek életképessége és morfológiája NCR-kezelés után.

A-L. SYTO 9/PI festett baktériumok konfokális mikroszkóppal megfigyelve. **M-X.** Baktériumok morfológiája SEM-el megfigyelve. **A, M.** Kezeletlen kontroll. **B, N.** CaNCR13, 3.125 μ M. **C, O.** CaNCR63, 3.125 μ M. **D, P.** CaNCR63₁₋₂₀, 3.125 μ M. **E, Q.** CaNCR63₁₅₋₃₄, 3.125 μ M. **F, R.** MsNCR443, 3.125 μ M. **G, S.** MsNCR463₁₆₋₃₅, 1.6 μ M. **H, T.** MsNCR463₁₇₋₃₀, 3.125 μ M. **I, U.** PsNCR349, 1.6 μ M. **J, V.** PsNCR349₂₆₋₅₀, 3.125 μ M. **K, W.** PsNCR349₃₁₋₅₀, 3.125 μ M. **L, X.** PsNCR352, 1.6 μ M.

A kezeletlen *A. baumannii* sejtek zöld jelet adtak, csak SYTO 9-el festődtek (31A. ábra), míg NCR-kezelés hatására a legtöbb esetben a sejtek színe pirosra váltott, ami ilyen rövid idő

alatt a sejtek pusztulására utal, nem csupán a membrán-áteresztőképesség változására. CaNCR13, MsNCR443, PsNCR349₂₆₋₅₀ és PsNCR349₃₁₋₅₀ kezelés hatására az összes sejt elpusztult (31B, F, J, K. ábra), míg CaNCR63, MsNCR463₁₆₋₃₅ MsNCR463₁₇₋₃₀ és PsNCR349 esetében zöld, élő sejtek is maradtak a kultúrában (31C, G, H, I. ábra), ami talán lassabb ölühatásra utal, míg ez a jelenség PsNCR352 esetében volt a legerősebb, ahol a sejtek jelentős része sárga színben játszott, ami kettős festődést jelent (32L. ábra).

SEM alapján a kontroll *A. baumannii* sejtek egyforma méretűek és alakúak, sima felszínnel (31M. ábra). Ugyanezt láttuk a PsNCR352 kezelésnél is (31X. ábra), ami szintén lassabb ölühatásra utalhat, akárcsak a konfokális mikroszkóppal megfigyelhető sárga szín (31L. ábra). MsNCR463₁₆₋₃₅ jelenlétében a sejtek vezikulákat termeltek (31S. ábra), míg a CaNCR63₁₋₂₀-szal és CaNCR63₁₅₋₃₄-gyel történő kezelés hatására a sejtek lizáltak és ellaposodtak (31P, Q. ábra). CaNCR63₁₅₋₃₄, MsNCR443, MsNCR463₁₆₋₃₅, MsNCR463₁₇₋₃₀ és PsNCR349₂₆₋₅₀ kezelés hatására a sejtek hosszúkkás, filamentáris formát vettek fel, és összetapadtak a pólusaiknál (31Q, R, S, T, V. ábra), ahogy a konfokális mikroszkóppal is láthattuk (31E, F, G, H, J. ábra).



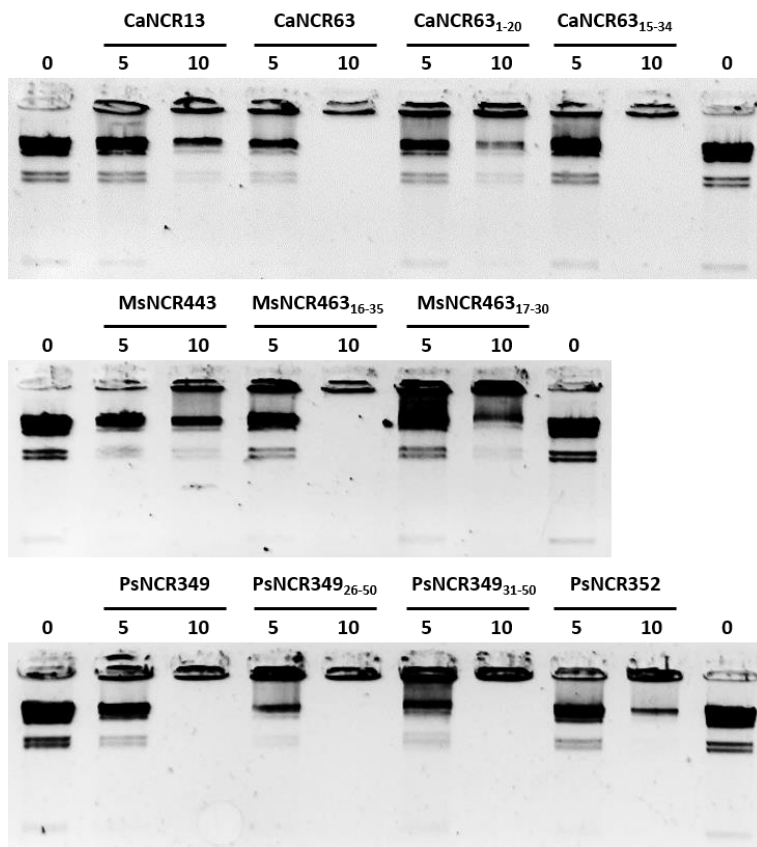
32. ábra: *C. albicans* sejtek életképessége és morfológiája NCR-kezelés után.

A-L. SYTO 9/PI festett baktériumok konfokális mikroszkóppal megfigyelve. **M-X.** Baktériumok morfológiája SEM-el megfigyelve. **A, M.** Kezeletlen kontroll. **B, N.** CaNCR13, 3.125 μ M. **C, O.** CaNCR63, 3.125 μ M. **D, P.** CaNCR63₁₋₂₀, 25 μ M. **E, Q.** CaNCR63₁₅₋₃₄, 3.125 μ M. **F, R.** MsNCR443, 3.125 μ M. **G, S.** MsNCR463₁₆₋₃₅, 1.6 μ M. **H, T.** MsNCR463₁₇₋₃₀, 1.6 μ M. **I, U.** PsNCR349, 1.6 μ M. **J, V.** PsNCR349₂₆₋₅₀, 3.125 μ M. **K, W.** PsNCR349₃₁₋₅₀, 3.125 μ M. **L, X.** PsNCR352, 1.6 μ M.

Az *A. baumannii*-hoz hasonlóan a *C. albicans* sejtek nagy része PI-dal festődött az NCR kezelést követően, míg a kontroll sejtek SYTO 9-cel festődtek (32A. ábra). A kezelt mintáknál a legtöbb zöld sejt a CaNCR63₁₋₂₀ esetében volt látható (32D. ábra), mely peptidnek volt a legmagasabb MFC értéke (25 µM), azaz ez volt a legkevésbé hatásos a gomba ellen. A SEM alapján is ez a minta volt a leginkább hasonló a kontrollhoz: mindkét esetben megfigyelhető volt az élesztő- és hifa-forma egyaránt (32M, P. ábra). A sejtek kilapultak CaNCR63, MsNCR463₁₆₋₃₅, MsNCR463₁₇₋₃₀, PsNCR349, PsNCR349₂₆₋₅₀ és PsNCR352 kezelés hatására (32O, S, T, U, V, X. ábra), míg az összezsugorodott sejtek aggregációja és egyféle hálószerű mátrix volt megfigyelhető a CaNCR13-mal, CaNCR63-mal, MsNCR443-mal és PsNCR352-vel történő kezelés után (32N, O, R, X. ábra).

4.6.5. Kationos NCR peptidok kötik és aggregálják a DNS-t

Az *M. truncatula* gümő szimbiotikus-sejtekben az NCR-ek hatására a bakteroidokban leáll a sejtosztódás, de a DNS szintézis nem gátlódik és így a genom amplifikálódik endoreduplikációs ciklusok révén (Mergaert és mtsai., 2006). Kérdés volt azonban, hogy van-e közvetlen kapcsolat, kötődés a pozitív töltésű NCR peptidok és a negatív töltésű nukleinsavak között. Ezért megvizsgáltuk, hogy a peptidok képesek-e megkötni illetve aggregálni a DNS-t *in vitro*. 100 ng HindIII restrikciós endonukleázzal emésztett λ-fág DNS-t inkubáltunk 30 percen át 5 és 10 µM NCR jelenlétében illetve peptid nélkül, majd agaróz gélelektroforézissal vizsgáltuk, hogy képződött-e peptid-DNS komplex (33. ábra).



33. ábra: Az NCR peptidek aggregálják a DNS-t.

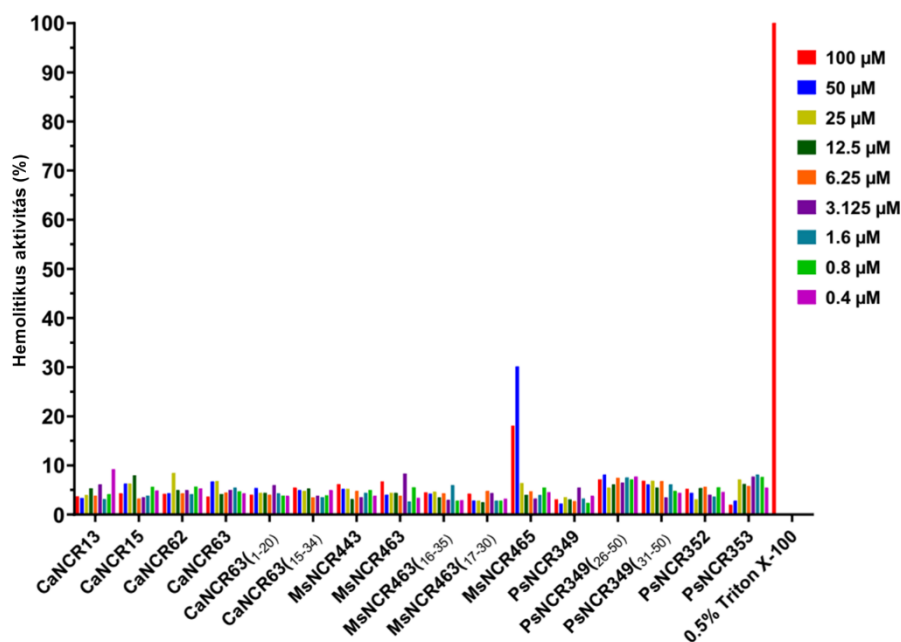
100 ng linearizált, HindIII restrikciós endonukleázzal emésztett Lambda fág DNS 0, 5 vagy 10 μ M NCR jelenlétében, gélelektroforézis után (1%-os agaróz gél). A gélbe futott DNS fragmentek méretük szerint váltak szét, míg az NCR-ek által aggregált DNS a zsebekben maradt. A DNS-hez kötődött etidium-bromid festék UV-világítás során válik láthatóvá.

Az NCR-nélküli kontroll mintában láthatók a HindIII restrikciós endonukleázzal emésztett λ -fág DNS fragmentek. 5 μ M peptid jelenlétében láthatók voltak a gélben a szabad DNS darabok, míg 10 μ M CaNCR63, CaNCR63₁₅₋₃₄, MsNCR463₁₆₋₃₅, PsNCR349, PsNCR349₂₆₋₅₀ és PsNCR349₃₁₋₅₀ aggregálta a DNS fragmenteket, és jelenlétükben a DNS összmenyisége vagy nagy része a zsebben maradt. A CaNCR63 N-terminális fragmentje, CaNCR63₁₋₂₀, jelentősen veszített a hatékonyságából, míg a C-terminális fragment, CaNCR63₁₅₋₃₄, alig. A két fragment pI értéke és nettó töltése nagyon hasonló, így feltehetően a tizenötödik aminosav utáni szakasz alkalmasabb a DNS-kötésre. A PsNCR349 esetében a pozitívan töltött lizinek (K) jelentős része a C-terminális részen található, és ennek megfelelően a hosszabb (PsNCR349₂₆₋₅₀) és rövidebb (PsNCR349₃₁₋₅₀) származéka is kötötte a DNS-t, még hatékonyabban is, mint az eredeti molekula. MsNCR463₁₇₋₃₀ kevésbé hatékonyan kötötte a DNS-t, mint a hosszabb fragment, MsNCR463₁₆₋₃₅, valószínűsítve, hogy az utolsó öt aminosav nagymértékben hozzájárul a DNS-kötő hatékonysághoz.

Az NCR247-hez hasonlóan más NCR-eknek is lehetnek fehérjepartnerei, illetve más célpontokat is támadhatnak.

4.6.6. Az IRLC NCR peptidek és származékaik nem okozták a humán vörösvérsejtek hemolízisét

Az AMP-k esetében az antimikrobiális hatékonyság mellett szintén fontos, hogy ne legyenek toxikusak az emberi sejtekre nézve. Ennek meghatározására alkalmas a hemolízis vizsgálat, mely során emberi vörösvérttesteket inkubáltunk 0,4-100 μM NCR vagy kontrollként használt 0,5% Triton X detergens jelenlétében, és a felszabaduló hemoglobin abszorbanciáját mértük OD₅₆₀-on (34. ábra).



34. ábra: Az NCR peptidek hemolitikus aktivitásának vizsgálata humán a vörösvérsejteken

NCR-ekkel kezelt emberi vörösvérttestből felszabaduló hemoglobin szintjének meghatározása spektrofotometriás mérésel történt. 0,5% Triton X-szel kezelt minta jelenti a 100% hemolízist, amihez az NCR-ekkel kezelt mintákat viszonyítottuk.

Az MsNCR465 kivételével egyik IRLC NCR sem mutatott hemolitikus aktivitást, így alkalmasak lehetnek terápiás alkalmazásra.

Az NCR-ek mindezen tulajdonságok alapján ideális antimikrobiális gyógyszerjelöltek.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az 1900-as évek közepén nagy meglepetést okozott, hogy a baktériumok is képesek differenciálódni, még hozzá hasonló mechanizmusok révén, mint az eukarióta sejtek. Ugyancsak váratlan felfedezés volt, hogy ezt a *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* szimbiózis esetében a növényi sejtekben termelődő több száz peptid irányítja, döntően az NCR-ek (Van de Velde és mtsai., 2010). Az NCR-ek csak a szimbiózisban szerepet játszó peptid-család, amely azonban hasonlóságot mutat a defenzinokkal, amelyek az eukarióták és így a növények immunitásának antimikrobiális peptidjei. Így nem kizárt, hogy az NCR-ek is a defenzinekből alakultak ki (Mergaert, 2018). Ennek megfelelően az elsődleges *in vitro* kísérletek a peptidek membránkárosító és baktériumölő hatását vizsgálták, amelyek egyszerűen és rutinszerűen kivitelezhetők. Az NCR géneknek 55 százaléka az átmeneti zónában fejeződik ki, ahol a baktériumokban bekövetkezik a sejtosztódás gátlása, és elkezdődik az endoreduplikáció, ezzel együtt a sejtek megnyúlása és a membrán átjárhatósága (permeabilitás) is megnövekszik. Ez utóbbi feltehetően a metabolitok és peptidek könnyebb szállítását biztosítja a szimbiotikus partnerek között a nitrogénkötő zónában.

Az érett NCR peptidek rendkívüli változatossága számtalan, még fel nem tárt biológiai aktivitás forrása lehet, amely a szimbiózison kívül feltehetően sokféle új felhasználási lehetőséget kínál. Egyes antimikrobiális peptidekről kimutatták, hogy képesek vírusok és ráksejtek elpusztítására is, így lehetséges – és ezt a laborunkban folyó kezdeti kísérletek is alátámasztják –, hogy az NCR-ek is rendelkeznek ilyen tulajdonsággal.

Az egyik nagy kérdés persze az, hogy hogyan működnek együtt a peptidek a szimbiotikus sejtekben, mi az egyes peptidek egyedi és együttes hozzájárulása a bakteroid differenciáció egyes lépéseihez. *M. truncatula*-ban elérhető inszerciós és deléciós mutánsok (Pislariu és mtsai., 2012), de NCR mutánsokat, talán a gének kisebb mérete miatt, ritkán lehet találni. További probléma, hogy mivel új NCR-ek génduplikációk révén jönnek létre, és az újabb kópiák esetleg csak 1-2 aminosavban különböznek egymástól, így több NCR funkciója redundáns, és a paralógok közül egy hiánya nem okoz fenotipikus elváltozást.

Az NCR247 hatásmechanizmusának vizsgálata rámutatott az NCR-ek széles körű, több struktúrát és folyamatot érintő tevékenységére (Lima és mtsai., 2020). Az eddig vizsgált NCR-ek biológiai funkciója az eddigi publikációk alapján kimerül abban, hogy hiányukban nem alakul ki a nitrogénkötő zóna, és a bakteroidok megfelelő differenciációja elmarad, vagyis az egyetlen megállapítás az, hogy ezek a peptidek szükségesek a baktériumok túléléséhez (Horváth és mtsai., 2015; Kim és mtsai., 2015). Ez nyilvánvalóan a növény által érzékelt

általános reakció, amit az abnormalis, abortív gümőfejlődés vált ki, és a baktériumok degradációját okozza, amivel a növények tápanyagot nyerhetnek vissza. A szimbiózis és a baktérium differenciáció megértésének feltétele az egyes, de legalábbis a nélkülözhetetlen peptidek funkciójának, molekuláris mechanizmusának feltárása és annak megismerése, hogyan idézhet elő mindez hatékonyabb nitrogénkötést.

A különböző hüvelyes növényekben a nitrogénkötés hatékonysága lényegesen eltér egymástól. A lucerna nitrogénkötési hatékonysága például több mint kétszerese a szójának és ötszöröse a babnak, melyek gümőiben nincs terminális differenciáció. Ha megismernénk, hogy mely NCR-ek szükségesek és elégségesek a terminális bakteriális differenciációhoz, akkor elvben a kevésbé hatékony növényekben is fokozni lehetne a nitrogénkötés hatékonyságát, és így termésük kevesebb műtrágyát igényelne és jóval környezetkímélőbb lenne. Ehhez ígéretes lehetőséget nyújt az a legújabb felfedezésünk, hogy az NCR gének minden növényben meglévő és a gümőkben is kifejeződő transzkripciós faktorokat használnak fel kifejeződésükhöz. Ezek, az NCR169 esetében, biztosították a gén expresszióját a szója szimbiotikus sejtjeiben, amely előidézte a terminális bakteroid differenciáció bizonyos kezdeti lépéseit (Zhang és mtsai., 2023). Természetesen egy gén kifejeződése a terminális differenciációhoz nem elégséges, és csak az NCR-ek megfelelő koktéljának (koktéljainak) a jelenlétében valósítható meg. Mindenesetre az általános, minden növényben előforduló AHL transzkripciós faktorok által biztosított kifejeződés megkönnyíti ezt a lehetőséget. A szója szimbiótái nem kötnek meg elégséges nitrogént a növény számára, de NCR-ek termeltetésével a szójagümőben és bakteroid differenciáció kiváltásával talán elérhető hatékonyabb nitrogénkötés és így a kiegészítőként adott műtrágya elhagyása.

Míg az érett NCR peptidek szimbiózisban betöltött szerepét több csoport is vizsgálja, addig az NCR szignál peptidek (SP) világa szinte egyáltalán nem kutatott terület, pedig a diverz szekvenciájú érett peptidekkel szemben ezek relatíve konzerváltak és így más evolúciós hajtóerő által formáltak (szétválasztó szelekció, illetve tisztító szelekció) (Alunni és mtsai., 2007). Az SP-k elsődleges feladata az érett peptid bejuttatása az endoplazmatikus retikulumba (ER), amihez az szükséges, hogy kellően hidrofób legyen és így felismerje a szignál felismerő részecske (SRP). Mivel a hús fehérjeépítő aminosavból tizenegy hidrofób vagy hidrofób oldallánccal rendelkezik, így az SP-ek evolúciója gyorsabb, mint az érett peptideké, hisz több nem-szinoním mutáció mellett is meg tudják őrizni hidrofóbicitásukat és így elsődleges funkciójukat (Williams és mtsai., 2000). Azonban az NCR SP-ek konzerváltsága felveti a lehetőségét, hogy további funkciójuk is lehet, amit erősít az a tény, hogy *M. truncatula*-ban és

az IRLC fajokban az általános egy darab szignál peptid peptidáz (SPP) gén helyett kettő van, és az egyik kifejeződése gümőspecifikus (nodSPP).

Az *M. truncatula* nodSPP gén elcsendesítésével bebizonyítottuk, hogy a nodSPP nélkülözhetetlen a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához és a gümő fejlődéséhez. A stabil transzgenikus nodSPP RNSi növények gümőiben a bakteroidok átalakulása megakad az IZ-ban a nodSPP hiányában, és nem alakul ki nitrogénkötő zóna. Számos, a sikeres szimbiózishoz elengedhetetlen növényi gén kifejeződése csökken a nodSPP RNSi gümőkben, köztük az NCR-ek túlnyomó része, továbbá olyan gének, melyek géntermékei szupresszálják a gazdanövény immunrendszerét, hogy elfogadja a szimbiótát mint idegen szervezetet, míg a növény védelmi folyamataiért, illetve a gümő öregedéséért felelős gének jelentősen túlműködnek. Ezek a génexpressziós változások arra utalnak, hogy a nodSPP hiányában a növény nem ismeri fel a rhizóbiumot mint szimbiótát és elpusztítja azt, ezzel megakasztva a gümőfejlődést is. NodSPP promóterrel szabályozott rizs SPP bevitelével képesek voltunk komplementálni a fenotípust, ezzel bizonyítva, hogy azt valóban a nodSPP hiánya okozta.

627 darab *Medicago truncatula* NCR szignál peptid közül 533 (85%) hidrofób *h*-régiójában található hélix-törő vagy destabilizáló cisztein vagy szerin, így ezeket SPP-szubsztrátnak vettük. Mind a gümőből, mind a csírából tisztított endoplazmatikus retikulum (ER) rendelkezett SPP-nek tulajdonított aktivitással, mivel az SPP-inhibitor (Z-LL)₂ keton jelenlétében a szintetikus peptidok életideje közel 50%-al megnőtt. Az ER elbontotta azokat a szignál peptidokat, melyeket SPP szubsztrátnak véltünk (NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP), míg az NCR247 SP-et, amit nem véltünk SPP szubsztrátnak, nem. Eddig nem volt ismert endogén célpontja egyetlen növényi SPP-nek sem.

A szintetikus NCR szignál peptidok *in vitro* kölcsönható partnereinek nagy része két különböző csoportba oszlanak aszerint, hogy az SPP-szenzitívek (NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP) vagy sem (NCR247 SP). Jelentős eltérés a két csoport között, hogy az SPP által elvágott NCR SP-ek a proteaszómával lépnek kapcsolatba, ami valószínűleg teljesen lebontja azokat, akár azért, hogy a molekula minél előbb eltűnjön, amint nincs rá szükség (Wang és mtsai., 2006), míg az SPP által érintetlenül hagyott NCR247 SP a COP9 szignáloszómával, aminek szerepe van többek között a sejtfejlődésben és a védelmi reakciók szabályzásában (Qin és mtsai., 2020), melyek nem működnek megfelelően a nodSPP RNSi gümőkben. Az NCR247 SP kapcsolatba léphet több kalmodulinnal, köztük egy szimbioszómába lokalizálódó gümőspecifikus kalmodulin-szerű molekulával is, mely fehérjecsald tagjai a jelátviteli útvonalak fontos elemei, és ezen keresztül hathatnak a gümőfejlődésre és szimbiózisra. Az NCR247 SP interakciós partnerei közt található a nodSPP is, ami megerősíti azt a feltételezést,

hogy az SPP-knek nem-proteolitikus funkciója is van (Lu és mtsai., 2012). Hipotézisünk szerint az SPP válogat az NCR SP fragmentek között: a többséget elvágja, amik ezután degradálódnak, míg az el nem vágott NCR SP-ek különböző jelátviteli útvonalakat befolyásolhatnak, és jelként szolgálhatnak arról, hogy a szimbiózis és a gümőfejlődés megfelelően zajlik.

Az NCR-ek *in vitro* antibakteriális aktivitása új kutatási területként jelent meg a laborunkban, de egyre több más intézetben is a világon. Az NCR-ek antimikrobiális aktivitásának legátfogóbb vizsgálatát 104 peptid felhasználásával mi végeztük el, amelyhez teljes hosszúságú, valamint rövidebb és módosított peptideket használtunk fel *M. truncatula* és négy más hüvelyes növényből származó NCR peptidből kiindulva (Lima és mtsai., 2022). Általánosan megállapítható, hogy a pozitív nettó töltés (2, de inkább 5 fölött) és a kationos izoelektromos pont szükséges, de nem elégséges feltétele az antimikrobiális aktivitásnak, mivel ez függ a peptid aminosav sorrendjétől, de a rendezetlen struktúra és az amfipatikusság is elősegíti az aktivitást (Lima és mtsai., 2022). A kationos AMP-k használatának legnagyobb hátulütője az érzékenységük a kétértékű kationokra, így a Ca^{2+} -mal és Mg^{2+} -mal szemben, melyek megakadályozzák a negatívan töltött bakteriális membránhoz való kötődésüket. Így a nem-kationos NCR-ek, például a neutrális NCR147, melyek feltehetően más hatásmechanizmussal támadják a kórokozókat, akár terápiás céllal is hasznosíthatók lehetnének (Lima és mtsai., 2022). Az NCR-ek nagy része pillanatszerűen hat (Jenei és mtsai., 2020; Lima és mtsai., 2022), több intracelluláris célpontjuk lehet, fehérjék, de nukleinsavak is (Lima és mtsai., 2020, 2022), így kevésbé valószínű a rezisztencia kialakulása ellenük. Továbbá az is fontos, hogy az antimikrobiális aktivitás mellett egyesek a már kialakult biofilmet is képesek elbontani, vagy gátolni a biofilm kialakulását (Lima és mtsai., 2022), illetve nem rendelkeznek az emberi vörösvérsejtekre káros hemolitikus aktivitással (Jenei és mtsai., 2020; Lima és mtsai., 2022). A rövidebb peptidváltozatok vizsgálatával meg tudtuk állapítani egyes NCR-ek esetében a minimális, az aktivitáshoz szükséges aminosav szekvenciát (csupán 20, vagy akár 14 aminosav), ami által ezen peptidek szintézise is költséghatékonyabb (Lima és mtsai., 2022). Kiderült az is, hogy egyes szubsztitúciók, mint például cisztein cseréje szerinre (Howan és mtsai., 2023), vagy triptofán cseréje 6-fluoro-triptofánra (Howan és mtsai., 2023) vagy alaninra (Szerencsés és mtsai., 2021), hogyan befolyásolják az NCR-aktivitást. Az NCR169 esetében a teljes hosszúságú peptid minimális antimikrobiális aktivitással rendelkezik, de feltérképezve az aktivitásért felelős régiót rövidebb peptid-származékok használatával, majd ezen szubsztitúciókat és módosításokat végezve, olyan származékokat tudtunk előállítani, amelyeknek a minimális baktericid koncentrációja (MBC) 0,8-1,6 μM -ra csökkent, ami 2 illetve 4 nagyságrenddel alacsonyabb, mint más klasszikus antibiotikumoké (Howan és mtsai., 2023).

Eredményeink alapján a pillangósvirágú növények gümőiben több százezer eddig fel nem fedezett, új hatású NCR termelődhet, melyek eredeti vagy módosított formájukban alkalmasak lehetnek az egyre kevésbé hatékony és egyre inkább fogyatkozó számú antibiotikum helyettesítésére. Mindezek a kísérleti eredmények nagy reményeket adnak arra, hogy a *Medicago truncatula*-ból és más IRLC fajokból származó NCR peptid származékokból hatékony, emberre és állatra veszélytelen, a gyógyászatban és a mezőgazdaságban alkalmazott antimikrobiális szerek legyenek. Míg a növényvédelemben való felhasználásuk akár rövid távon megvalósulhat, a gyógyászatban való alkalmazásuk további lépéseket igényel, hiszen meg kell felelniük a gyógyszerjelöltekkel szemben támasztott követelményeknek, és többéves, többfázisú klinikai vizsgálatokkal kell bizonyítani veszélytelen és hatékony alkalmazásukat. Mivel ezt kutatási pályázatból lehetetlen megvalósítani, ehhez nagy gyógyszergyárak érdeklődése és pénzügyi támogatása kell, ami sajnos az egész világon hiányzik jelenleg.

Az NCR peptidek rendkívüli sokfélesége alapján valószínűsíthető, hogy ezek további, eddig még feltáratlan funkciókat biztosítanak. A világ számos intézetében foglalkoznak a növényekből származó, speciális biológiai aktivitással rendelkező molekulákkal. Az NCR-ek minden bizonnyal értékes és esetleg hiánypótló tulajdonságokat tudnának biztosítani, ha részletes vizsgálatuk megindulna.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori disszertációm elkészítése több éves kutatómunka eredménye, melynek során sok embertől kaptam segítséget.

Külön köszönettel tartozom a munkacsoportunk témavezetőjének Prof. Dr. Kondorosi Évának. Neki köszönhetem a lehetőséget, hogy az ELTE-ről friss diplomásként Budapestről Szegedre kerülhettem a Szegedi Biológiai Kutatóközpontba és olyan izgalmas témában dolgozhatok, melynek tudományos, mezőgazdasági és egészségügyi vonatkozásai is vannak az NCR peptidok révén. Munkám során témavezetőmtől nem csak kimagasló szakmai segítséget kaptam, hanem minden lehetőséget is, hogy szakmailag fejlődjek és részt vehessek hazai és nemzetközi konferenciákon egyaránt. Fáradhatatlan munkabíráásával és inspiráló egyéniségével nem csak motivált a kutatásaim során, hanem mindvégig példát is mutatott nekem.

Ezúton köszönöm Dr. Endre Gabriellának és Dr. Kereszt Attilának a szakmai segítségüket.

A disszertációmban közöltek csoportmunka eredményei, ezért köszönettel tartozom munka- és szerzőtársaimnak: Fehérné Juhász Erzsébetnek, Kiss Edinának és Dr. Nagy Olgának a segítségüket a stabil transzgenikus vonalak létrehozásában, Dr. Szűcs Attilának a transzkriptom adatainak elemzésében, Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak a proteomikai adatokat, Dr. Domonkos Ildikónak, hogy megtanított a SEM használatára, továbbá Dr. Senlei Zhang-nak, Dr. Ting Wang-nak, Jenei Sándornak, Farkas Attilának, Makra Máténak, Dr. Balaji Baburao Rathod-nak, Dr. Tímár Editnek a közös munkát, a jó együttműködést és a baráti légkört.

Végül köszönettel tartozom feleségemnek, Dr. Lima Hilda Anikónak a békés családi háttérért, és a motivációért, továbbá kisfiamnak és édesanyámnak is a szeretettelgi támogatásukért.

ÖSSZEFOGLALÁS

Pillangósvirágú növények és rhizobium talajbaktériumok szimbiózisa gyökérgümők fejlődéséhez vezet, ahol a gümősejtekben a baktériumok képessé válnak a levegő nitrogénjének ammóniává történő redukciójára. Az IRLC növényekben a rhizobium baktériumok elveszítik osztódási képességüket, így differenciálódásuk véglegesnek mondható (terminális differenciáció). *Medicago* fajokban a nitrogénkötő baktériumok genomja sokszorososa (~20x) a szabadon élő formáknak, és 5-10-szer nagyobb mérettel, megnyúlt-elágazó morfológiával, valamint átjárhatóbb membránnal rendelkeznek. A terminális differenciáció hatékonyabb nitrogénkötést biztosít, amelyet a növény-partner irányít a gümőben kifejeződő szimbiotikus növényi peptidok segítségével. A *Medicago truncatula* szimbiotikus modellnövényben ~700 gén kódolja a gümőspecifikus ciszteinben gazdag NCR peptideket, amelyek a bakteroid differenciáció különböző lépéseit szabályozzák. A legtöbb NCR, több mint 300, abban a néhány sejtrétegben fejeződik ki, ahol a sejtosztódás gátlása és a baktériumok megnyúlása megy végbe.

Munkánk egyrészt a legkisebb peptid, az NCR247 funkciójának a megismerésére irányult, másrészt az *NCR* gének szabályozására. Vizsgáltuk az NCR szignál peptid (NCR SP) konzerváltságát és az *NCR* génekkel együtt kifejeződő gümő-specifikus szignál peptid peptidázal (nodSPP) való kapcsolatukat. A szimbózis mellett vizsgáltuk a kationos NCR peptidok *in vitro* antimikrobiális spektrumát, a peptidok fizikokémiai tulajdonságait és hatásmechanizmusukat.

Az NCR247 hatásmechanizmusa

Az NCR247 peptid: 24 aminosav hosszú, 4 konzervált ciszteinnel rendelkezik, kationos (izoelektromos pontja 10,15) és pozitív nettó töltésű (+6) molekula, melynek magas Boman indexe (4,63 kcal/mol) erős fehérjekötő képességet mutat. *In vitro* körülmények között magas koncentrációkban károsítja a membránt, vezikulák képződését és a baktériumok pusztulását idézi elő. Alacsony koncentrációban membránkárosítás nélkül képes a bakteriális citoszolba lépni, ahol transzkripciós változásokat idéz elő, befolyásolja a translációt és specifikusan kötődik a sejtosztódásban kulcs szerepet játszó FtsZ fehérjéhez, megakadályozva annak polimerizációját és így a sejtosztódáshoz szükséges szeptum képződését, valamint kötődik a szimbiózisokban fontos szerepet játszó GroEL chaperonhoz, valamint számos riboszómális fehérjéhez.

Az NCR gének regulációja

Az *NCR* gének szimbiózis-specifikus evolúciója alapján feltételeztük, hogy szabályozásukra velük együtt gümőspezifikus transzkripciós faktorok fejlődtek ki. Az *NCR169* gént használtuk modellként, mivel ennek a promótere olyan motívumokat tartalmaz, amelyek 288 *NCR* promóterében is jelen vannak és gümőspezifikus kifejeződést biztosítanak. Kimutattuk, hogy az *NCR169* promóterrel meghajtott GUS riporter kifejeződik szója gümőben, ahol természetes állapotában nincsenek *NCR* gének és terminális bakteroid differenciáció sem figyelhető meg. *NCR169* jelenlétében a szója szimbiótáin a differenciáció jeleit figyelhettük meg, így megnyúlt bakteroidokat, valamint a genomméretük kismértékű növekedését. *M. truncatula* gümőben a bakteriális BacA ABC-transzporter szükséges ahhoz, hogy az *NCR* peptidek a szimbiótába jussanak és hasonlóképpen a BacA ortológ, BclA is nélkülözhetetlen volt az *NCR169* működéséhez szójagümőkben. Kiderítettük, hogy az *NCR169* expressziójához két AHL transzkripciós faktor szükséges, melyek nem gümőspezifikusak és általánosan előfordulnak növényekben.

Az NCR szignál peptidek (SP) evolúciója és kapcsolatuk a nodSPP-al

Az *NCR*-ek a teljes gümőtranszkriptom 5%-át teszik ki, így az *NCR* SP-ek is nagy mennyiségben jelen vannak, ami magyarázhatja a szignál peptidáz komplex SPC22 és a szignál peptid peptidáz (SPP) gümőspezifikus kópiájának (*dnf1*, *nodSPP*) a kialakulását és funkcióját. Az SPP az SP *h*-régió hidrofób aminosavai között található hélix destabilizáló cisztein vagy szerin mellett hasít és a szerin az *NCR* SP *h*-régiók 72%-ában konzervált helyen található meg. Az izolált, SPP-t tartalmazó endoplazmatikus retikulum membrán elvágja az SPP célpontnak prediktált *NCR* SP-eket (*NCR120* SP, *NCR216* SP, *NCR252* SP), míg az SPP célpontnak nem prediktált *NCR247* SP-t nem. Affinitás kromatográfia alapján az *NCR* SP-ek kölcsönható fehérjepartnereit két csoportba lehet sorolni aszerint, hogy az SPP vágja őket vagy sem. Míg az előbbi csoport tagjait a proteaszóma bonthatja le az SPP hasítása után, addig az utóbbi csoportban található érintetlen SP-ek a jelátviteli útvonalakat (*COP9* szignalszóma, kalmodulin) befolyásolhatják.

Az NCR peptidek antimikrobiális aktivitása

Az eddig legátfogóbb kísérletben, mely az NCR-ek antimikrobiális hatását vizsgálta, 78 db *M. truncatula* NCR-t, 12 db nem-Mt IRLC NCR-t és azok 14 rövidebb származékát teszteltük nyolc humán patogén baktérium ellen (multirezisztens ESKAPE patogének: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, továbbá *Listeria monocytogenes* és *Salmonella enteritidis*). Nagy általánosságban elmondható, hogy a kationos izoelektromos pont és a pozitív nettó töltés szükséges, de nem elégséges feltétele az antimikrobiális hatásnak, hisz ezek mellett a rendezetlen szerkezet és az amfipatikus jelleg, valamint az aminosav sorrend is rendkívül fontos hatással vannak az NCR-ek hatékonyságára. Az NCR073, az NCR336 és az NCR358 alacsony koncentrációban eredményes volt mind a nyolc baktérium ellen, így érdemes ezeket a peptideket további vizsgálatoknak alávetni.

Az IRLC NCR-ek és származékaik antimikrobiális hatását részletesebben is megvizsgáltuk *A. baumannii* és *Candida albicans*, és a WHO kiemelt bakteriális és gomba kórokozókkal szemben. Ezek súlyos egészségügyi problémákat okoznak elsősorban a kórházi betegellátásban, biofilmek képzésével a hosszan tartó és visszatérő fertőzések esetében. A tesztelt peptidek jelentős mértékben elbontották a biofilmet *C. albicans* esetében, továbbá mindkét mikroorganizmust gyorsan és alacsony koncentrációban pusztították el, miközben nem váltottak ki hemolízist emberi vörösvérsejteknel. Azonosítottunk hatékony, rövidebb peptid származékokat is, ami szintézisüket jelentősen költséghatékonyá teszi.

SUMMARY

The symbiosis of leguminous plants and Rhizobium soil bacteria leads to the development of root nodules, where the bacteria in the nodules are able to reduce the atmospheric nitrogen to ammonia. In IRLC plants, Rhizobium bacteria lose their ability to divide, so their differentiation is final (terminal differentiation). In *Medicago* species, the genome of nitrogen-fixing bacteria is many times larger (~20x) than in the free-living form, and they have 5-10 times larger size, elongated-branched morphology and more permeable membranes. Terminal differentiation provides more efficient nitrogen fixation, which is controlled by the plant partner through symbiotic plant peptides expressed in the nodule. In the symbiotic model plant *Medicago truncatula*, ~700 genes encode nodule-specific cysteine-rich NCR peptides that regulate different steps of bacteroid differentiation. Most NCRs, more than 300, are expressed in the few cell layers where bacterial cell division inhibition and bacterial elongation occur.

Our work has focused both on understanding the function of the smallest peptide, NCR247, and on the regulation of *NCR* genes. We investigated the conservation of NCR signal peptides (NCR SPs) and their connection to the nodule-specific signal peptide peptidase (nodSPP), which is co-expressed with *NCR* genes. In addition to symbiosis, we investigated the *in vitro* antimicrobial spectrum of cationic NCR peptides, their physicochemical properties and their mechanism of action.

Mechanism of action of NCR247

NCR247 is the shortest natural *M. truncatula* NCR peptide: it is 24 amino acids long, has 4 conserved cysteines, it is cationic (isoelectric point 10.15), has positive net charge (+6), and high Boman index (4.63 kcal/mol), which marks a strong protein binding ability. Under *in vitro* conditions, it damages the membrane at high concentrations, induces vesicle formation and bacterial death. At low concentrations it can enter the bacterial cytosol without damaging the membrane, where it induces transcriptional changes, affects translation and binds specifically to the FtsZ protein, which plays a key role in cell division, preventing FtsZ polymerization and thus the formation of the septum necessary for cell division, and binds to the GroEL chaperone, which plays an important role in symbioses, as well as to several ribosomal proteins.

Regulation of NCR genes

Based on the symbiosis-specific evolution of *NCR* genes, we hypothesized that they may have evolved together with symbiosis-specific transcription factors. The *NCR169* gene was used as a model, as its promoter contains motifs that are also present in the promoter of 288 *NCRs* and confer nodule-specific expression. We have shown that the GUS reporter driven by the *NCR169* promoter is expressed in soybean nodules, where in its natural state no *NCR* genes are present and no terminal bacteroid differentiation is observed. In the presence of *NCR169*, we observed signs of differentiation were in soybean symbionts, such as elongated bacteroids and a small increase in their genome size. In *M. truncatula* nodules, the bacterial BacA ABC-transporter was required for the NCR peptides to enter into the symbiote and similarly the BacA ortholog, BclA, was also essential for *NCR169* function in soybean nodules. We found that *NCR169* expression requires two AHL transcription factors, which are not nodule-specific and are widely present in plants.

Evolution of NCR signal peptides (SP) and their relationship with nodSPP

NCRs account for 5% of the total nodule transcriptome and thus *NCR* SPs are abundant, which may explain the appearance and function of the nodule-specific copies of the signal peptidase complex SPC22 and the signal peptide peptidase (SPP) (*dnf1*, *nodSPP*). SPP cleaves adjacent to a helix destabilizing cysteine or serine located between the hydrophobic amino acids of the SP *h*-region and serine is conserved in 72% of *NCR* SP *h*-regions. The isolated SPP-containing endoplasmic reticulum membrane cleaves *NCR* SPs predicted to be SPP targets (*NCR120* SP, *NCR216* SP, *NCR252* SP), whereas *NCR247* SP which is not predicted as SPP target remains intact. Based on affinity chromatography, the interaction protein partners of *NCR* SPs can be sorted into two groups according to whether they cleaved by SPP or not. While members of the former group may be degraded by the proteasome after cleavage by SPP, intact SPs in the latter group may affect signalling pathways (COP9 signalosome, calmodulin).

Antimicrobial activity of NCR peptides

In the most comprehensive experiment to date investigating the antimicrobial activity of NCRs, 78 *M. truncatula* NCRs, 12 non-Mt IRLC NCRs and their 14 shorter derivatives were tested against eight human pathogenic bacteria (multi-resistant ESKAPE pathogens: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, as well as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*). In general, a cationic isoelectric point and a positive net charge are necessary but not sufficient properties for antimicrobial activity, since, in addition to these, disordered structure and amphipathicity, as well as amino acid sequence, have a very important influence on the efficacy of NCRs. NCR073, NCR336 and NCR358 were effective against all eight bacteria at low concentrations, so these peptides are worthy of further investigation.

The antimicrobial activity of the IRLC NCRs and their derivatives was investigated in more detail against *A. baumannii* and *Candida albicans*, and against WHO top priority bacterial and fungal pathogens. These cause serious health problems, especially in hospital care, by forming biofilms in cases of prolonged and recurrent infections. The tested peptides significantly degraded the biofilm of *C. albicans* and rapidly killed both microorganisms at low concentrations, while not causing haemolysis in human red blood cells. We also identified efficient shorter peptide derivatives, making their synthesis significantly cost-effective.

IRODALOMJEGYZÉK

- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* 37, 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alunni, B., Kevei, Z., Redondo-Nieto, M., Kondorosi, A., Mergaert, P., Kondorosi, E., 2007. Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 1138–1148. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1138>
- Arimura, S., 2018. Fission and fusion of plant mitochondria, and genome maintenance. *Plant Physiol.* 176, 152–161. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01025>
- Arnold, M.F.F., Shabab, M., Penterman, J., Boehme, K.L., Griffiths, J.S., Walker, G.C., 2017. Genome-wide sensitivity analysis of the microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* to symbiotically important, defensin-like host peptides. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01060-17>
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R.P., Conceição, A. de S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K.G., Doyle, J.J., Duminil, J., Egan, A.N., Estrella, M. de la, Falcão, M.J., Filatov, D.A., Fortuna-Perez, A.P., Fortunato, R.H., Gagnon, E., Gasson, P., Rando, J.G., Tozzi, A.M.G. de A., Gunn, B., Harris, D., Haston, E., Hawkins, J.A., Herendeen, P.S., Hughes, C.E., Iganci, J.R.V., Javadi, F., Kanu, S.A., Kazempour-Osaloo, S., Kite, G.C., Klitgaard, B.B., Kochanovski, F.J., Koenen, E.J.M., Kovar, L., Lavin, M., Roux, M. le, Lewis, G.P., Lima, H.C. de, López-Roberts, M.C., Mackinder, B., Maia, V.H., Malécot, V., Mansano, V.F., Marazzi, B., Mattapha, S., Miller, J.T., Mitsuyuki, C., Moura, T., Murphy, D.J., Nageswara-Rao, M., Nevado, B., Neves, D., Ojeda, D.I., Pennington, R.T., Prado, D.E., Prenner, G., Queiroz, L.P. de, Ramos, G., Filardi, F.L.R., Ribeiro, P.G., Rico-Arce, M. de L., Sanderson, M.J., Santos-Silva, J., São-Mateus, W.M.B., Silva, M.J.S., Simon, M.F., Sinou, C., Snak, C., Souza, É.R. de, Sprent, J., Steele, K.P., Steier, J.E., Steeves, R., Stirton, C.H., Tagane, S., Torke, B.M., Toyama, H., Cruz, D.T. da, Vatanparast, M., Wieringa, J.J., Wink, M., Wojciechowski, M.F., Yahara, T., Yi, T., Zimmerman, E., 2017. A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive

- phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *TAXON* 66, 44–77.
<https://doi.org/10.12705/661.3>
- Balogh, E., Mosolygó, T., Tiricz, H., Szabó, Á., Karai, A., Kerekes, F., Virók, D., Kondorosi, É., Burián, K., 2014. Anti-chlamydial effect of plant peptides. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 61, 229–239. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.2.12>
- Bergersen, F.J., 1955. The cytology of bacteroids from root nodules of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *J. Gen. Microbiol.* 13, 411–419.
<https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-411>
- Berrabah, F., Bourcy, M., Eschstruth, A., Cayrel, A., Guefrachi, I., Mergaert, P., Wen, J., Jean, V., Mysore, K.S., Gourion, B., Ratet, P., 2014. A nonRD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytol.* 203, 1305–1314. <https://doi.org/10.1111/nph.12881>
- Berrabah, F., Ratet, P., Gourion, B., 2015. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. *J. Exp. Bot.* 66, 1977–1985.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru545>
- Bertioli, D.J., Cannon, S.B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A.D., Cannon, E.K.S., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., Ren, L., Moretzsohn, M.C., Shirasawa, K., Huang, W., Vidigal, B., Abernathy, B., Chu, Y., Niederhuth, C.E., Umale, P., Araújo, A.C.G., Kozik, A., Do Kim, K., Burow, M.D., Varshney, R.K., Wang, X., Zhang, X., Barkley, N., Guimarães, P.M., Isobe, S., Guo, B., Liao, B., Stalker, H.T., Schmitz, R.J., Scheffler, B.E., Leal-Bertioli, S.C.M., Xun, X., Jackson, S.A., Michelmore, R., Ozias-Akins, P., 2016b. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nat. Genet.* 48, 438–446.
<https://doi.org/10.1038/ng.3517>
- Bourcy, M., Brocard, L., Pislariu, C.I., Cosson, V., Mergaert, P., Tadege, M., Mysore, K.S., Udvardi, M.K., Gourion, B., Ratet, P., 2013. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. *New Phytol.* 197, 1250–1261.
<https://doi.org/10.1111/nph.12091>
- Brink, C., Postma, A., Jacobs, K., 2017. Rhizobial diversity and function in rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia* spp.) plants: A review. *South Afr. J. Bot., Herbal Teas* 110, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.025>

- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., Goldstein, J.L., 2000. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391–398. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80675-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80675-3)
- Catalano, C.M., Lane, W.S., Sherrier, D.J., 2004b. Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules. *ELECTROPHORESIS* 25, 519–531. <https://doi.org/10.1002/elps.200305711>
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 1999. The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* 18, 4476–4484. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.16.4476>
- CHANDLER, M.R., DATE, R.A., ROUGHLEY, R.J., 1982. Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by rhizobium. *J. Exp. Bot.* 33, 47–57. <https://doi.org/10.1093/jxb/33.1.47>
- Chen, H., Yuan, D., Wu, A., Lin, X., Li, X., 2021. Review of low-temperature plasma nitrogen fixation technology. *Waste Dispos. Sustain. Energy* 3, 201–217. <https://doi.org/10.1007/s42768-021-00074-z>
- Chen, W.F., Meng, X.F., Jiao, Y.S., Tian, C.F., Sui, X.H., Jiao, J., Wang, E.T., Ma, S.J., 2023. Bacteroid development, transcriptome, and symbiotic nitrogen-fixing comparison of *Bradyrhizobium arachidis* in nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) and medicinal legume *Sophora flavescens*. *Microbiol. Spectr.* 0, e01079-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01079-22>
- Choi, H.-K., Mun, J.-H., Kim, D.-J., Zhu, H., Baek, J.-M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G.B., Young, N.D., Cook, D.R., 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15289–15294. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402251101>
- Choi, I.-S., Jansen, R., Ruhlman, T., 2019. Lost and found: return of the inverted repeat in the legume clade defined by its absence. *Genome Biol. Evol.* 11, 1321–1333. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz076>
- Chou, M.-X., Wei, X.-Y., Chen, D.-S., Zhou, J.-C., 2006. Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization. *J. Exp. Bot.* 57, 2673–2685. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl030>

- Clarke, V.C., Loughlin, P.C., Day, D.A., Smith, P.M.C., 2014. Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Front. Plant Sci.* 5.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00699>
- Cools, T.L., Struyfs, C., Cammue, B.P., Thevissen, K., 2017. Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiol.* 12, 441–454. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0181>
- Cosson, V., Eschstruth, A., Ratet, P., 2015. *Medicago truncatula* transformation using leaf explants, in: Wang, K. (Ed.), *Agrobacterium Protocols: Volume 1, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 43–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_4
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., Wang, Z.-Y., 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223, 1344–1354.
<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0268-2>
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: A Sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Czernic, P., Gully, D., Cartieaux, F., Moulin, L., Guefrachi, I., Patrel, D., Pierre, O., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Nguyen, P., Gressent, F., Silva, C.D., Poulain, J., Wincker, P., Rofidal, V., Hem, S., Barrière, Q., Arrighi, J.-F., Mergaert, P., Giraud, E., 2015. Convergent evolution of endosymbiont differentiation in Dalbergioid and inverted repeat-lacking cade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiol.* 169, 1254–1265. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00584>
- Dart, P.J., Mercer, F.V., 1966. Fine structure of bacteroids in root nodules of *Vigna sinensis*, *Acacia longifolia*, *Viminaria juncea*, and *Lupinus angustifolius*. *J. Bacteriol.* 91, 1314–1319.
- Delaux, P.-M., Radhakrishnan, G., Oldroyd, G., 2015. Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 95–99.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.003>
- diCenzo, G.C., Zamani, M., Ludwig, H.N., Finan, T.M., 2017. Heterologous complementation reveals a specialized activity for BacA in the *Medicago–Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 30, 312–324.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-02-17-0030-R>

- Dixon, R.O.D., 1967. The origin of the membrane envelope surrounding the bacteria and bacteroids and the presence of glycogen in clover root nodules. *Arch. Für Mikrobiol.* 56, 156–166. <https://doi.org/10.1007/BF00408766>
- Doyle, J.J., Luckow, M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131, 900–910. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018150>
- Durán, D., Albareda, M., García, C., Marina, A.-I., Ruiz-Argüeso, T., Palacios, J.-M., 2021. Proteome analysis reveals a significant host-specific response in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* endosymbiotic cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 20, 100009. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002276>
- Dürgő, H., Klement, É., Hunyadi-Gulyás, E., Szűcs, A., Kereszt, A., Medzihradszky, K.F., Kondorosi, É., 2015a. Identification of nodule-specific cysteine-rich plant peptides in endosymbiotic bacteria. *PROTEOMICS* 15, 2291–2295. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400385>
- Elliott, G.N., Chen, W.-M., Chou, J.-H., Wang, H.-C., Sheu, S.-Y., Perin, L., Reis, V.M., Moulin, L., Simon, M.F., Bontemps, C., Sutherland, J.M., Bessi, R., de Faria, S.M., Trinick, M.J., Prescott, A.R., Sprent, J.I., James, E.K., 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol.* 173, 168–180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01894.x>
- Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat. Geosci.* 1, 636–639. <https://doi.org/10.1038/ngeo325>
- Farkas, A., Maróti, G., Dürgő, H., Györgypál, Z., Lima, R.M., Medzihradszky, K.F., Kereszt, A., Mergaert, P., Kondorosi, É., 2014. *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5183–5188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404169111>
- Farkas, A., Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, É., 2017. Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00051>
- Fernando, S.A., Gray, T.J., Gottlieb, T., 2017. Healthcare-acquired infections: prevention strategies. *Intern. Med. J.* 47, 1341–1351. <https://doi.org/10.1111/imj.13642>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M., 2013. The

- global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Frühling, M., Albus, U., Hohnjec, N., Geise, G., Pühler, A., Perlick, A.M., 2000. A small gene family of broad bean codes for late nodulins containing conserved cysteine clusters. *Plant Sci.* 152, 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00219-8)
- Gavrin, A., Kulikova, O., Bisseling, T., Fedorova, E.E., 2017. Interface symbiotic membrane formation in root nodules of *Medicago truncatula*: the role of synaptotagmins MtSyt1, MtSyt2 and MtSyt3. *Front. Plant Sci.* 8.
- Geurts, R., Bisseling, T., 2002. Rhizobium nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14, s239–s249. <https://doi.org/10.1105/tpc.002451>
- Golinowski, W., Kopcínska, J., Borucki, W., 1987. The morphogenesis of lupine root nodules during infection by *Rhizobium lupini*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 56, 687–703. <https://doi.org/10.5586/asbp.1987.058>
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G., 2015. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Griesmann, M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M.B., Billault-Penneteau, B., Laouressgues, D., Keller, J., Imanishi, L., Roswanjaya, Y.P., Kohlen, W., Pujic, P., Battenberg, K., Alloisio, N., Liang, Y., Hilhorst, H., Salgado, M.G., Hocher, V., Gherbi, H., Svistoonoff, S., Doyle, J.J., He, S., Xu, Y., Xu, S., Qu, J., Gao, Q., Fang, X., Fu, Y., Normand, P., Berry, A.M., Wall, L.G., Ané, J.-M., Pawlowski, K., Xu, X., Yang, H., Spannagl, M., Mayer, K.F.X., Wong, G.K.-S., Parniske, M., Delaux, P.-M., Cheng, S., 2018. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* 361. <https://doi.org/10.1126/science.aat1743>
- Guefrachi, I., Nagymihaly, M., Pislariu, C.I., Van de Velde, W., Ratet, P., Mars, M., Udvardi, M.K., Kondorosi, E., Mergaert, P., Alunni, B., 2014. Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15, 712. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-712>
- Guefrachi, I., Pierre, O., Timchenko, T., Alunni, B., Barrière, Q., Czernic, P., Villaécija-Aguilar, J.-A., Verly, C., Bourge, M., Fardoux, J., Mars, M., Kondorosi, E., Giraud, E., Mergaert, P., 2015a. *Bradyrhizobium* BclA is a peptide transporter required for

- bacterial differentiation in symbiosis with *Aeschynomene* legumes. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 28, 1155–1166. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0094-R>
- Guefrachi, I., Verly, C., Kondorosi, É., Alunni, B., Mergaert, P., 2015b. Role of the bacterial BacA ABC-transporter in chronic infection of nodule cells by rhizobium bacteria, in: biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 315–324. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch31>
- Haag, A.F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'Angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G.P., 2011. Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLOS Biol.* 9, e1001169. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001169>
- Haag, A.F., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R., Baloban, M., Wilson, H.M., Mergaert, P., Zanda, M., Ferguson, G.P., 2012. Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *J. Biol. Chem.* 287, 10791–10798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311316>
- Hakoyama, T., Niimi, K., Watanabe, H., Tabata, R., Matsubara, J., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Jichun, L., Matsumoto, T., Tatsumi, K., Nomura, M., Tajima, S., Ishizaka, M., Yano, K., Imaizumi-Anraku, H., Kawaguchi, M., Kouchi, H., Suganuma, N., 2009. Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. *Nature* 462, 514–517. <https://doi.org/10.1038/nature08594>
- Harding, C.M., Hennon, S.W., Feldman, M.F., 2018. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- Hartmann, L.S., Barnum, S.R., 2010. Inferring the evolutionary history of Mo-dependent nitrogen fixation from phylogenetic studies of nifK and nifDK. *J. Mol. Evol.* 71, 70–85. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9365-8>
- Hassen, A.I., Lamprecht, S.C., Bopape, F.L., 2020. Emergence of β -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume-rhizobium host specificity dogma. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 40. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2811-x>
- He, J., Benedito, V.A., Wang, M., Murray, J.D., Zhao, P.X., Tang, Y., Udvardi, M.K., 2009. The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* 10, 441. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-441>

- Higashi, S., Abe, M., Reyes, G.D., Manguiat, I.J., 1987. Electron microscopic studies of the root nodule of *Pterocarpus indicus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 33, 241–245.
<https://doi.org/10.2323/jgam.33.241>
- Hoffmann, B., Trinh, T.H., Leung, J., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 1997. A new *Medicago truncatula* line with superior *in vitro* regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. Mol. Plant-Microbe Interactions® 10, 307–315. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.307>
- Horváth, B., Domonkos, Á., Kereszt, A., Szűcs, A., Ábrahám, E., Ayaydin, F., Bóka, K., Chen, Y., Chen, R., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Kondorosi, É., Kaló, P., 2015. Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 15232–15237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500777112>
- Howan, D.H.O., Jenei, S., Szolomajer, J., Endre, G., Kondorosi, É., Tóth, G.K., 2023. Enhanced antibacterial activity of substituted derivatives of NCR169C peptide. Int. J. Mol. Sci. 24, 2694. <https://doi.org/10.3390/ijms24032694>
- Huang, R., Snedden, W.A., diCenzo, G.C., 2022. Reference nodule transcriptomes for *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa* cv. Algonquin.
<https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479627>
- Humphreys, J., Lan, R., Tao, S., 2021. Development and recent progress on ammonia synthesis catalysts for Haber–Bosch process. Adv. Energy Sustain. Res. 2, 2000043.
<https://doi.org/10.1002/aesr.202000043>
- Istvánék, J., Jaros, M., Krenek, A., Řepková, J., 2014a. Genome assembly and annotation for red clover (*Trifolium pratense*; Fabaceae). Am. J. Bot. 101, 327–337.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1300340>
- Ivanov, S., Fedorova, E.E., Limpens, E., Mita, S.D., Genre, A., Bonfante, P., Bisseling, T., 2012. Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 8316–8321.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109>
- Jenei, S., Tiricz, H., Szolomájér, J., Tímár, E., Klement, É., Al Bouni, M.A., Lima, R.M., Kata, D., Harmati, M., Buzás, K., Földesi, I., Tóth, G.K., Endre, G., Kondorosi, É., 2020a. Potent chimeric antimicrobial derivatives of the *Medicago truncatula* NCR247 symbiotic peptide. Front. Microbiol. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00270>

- Kaewklom, S., Wongchai, M., Petvises, S., Hanpithakphong, W., Aunpad, R., 2018. Structural and biological features of a novel plant defensin from *Brugmansia x candida*. PLoS ONE 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201668>
- Kalita, M., Małek, W., 2020. Root nodules of *Genista germanica* harbor *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* bacteria exchanging nodC and nodZ genes. Syst. Appl. Microbiol. 43, 126026. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126026>
- Kang, T.S., Radić, Z., Talley, T.T., Jois, S.D.S., Taylor, P., Kini, R.M., 2007. Protein folding determinants: structural features determining alternative disulfide pairing in alpha- and chi/lambda-conotoxins. Biochemistry 46, 3338–3355. <https://doi.org/10.1021/bi061969o>
- Karmakar, K., Kundu, A., Rizvi, A.Z., Dubois, E., Severac, D., Czernic, P., Cartieaux, F., DasGupta, M., 2018. Transcriptomic analysis with the progress of symbiosis in ‘crack-entry’ legume *Arachis hypogaea* highlights its contrast with ‘infection thread’ adapted legumes. Mol. Plant-Microbe Interactions® 32, 271–285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-18-0174-R>
- Karunakaran, R., Haag, A.F., East, A.K., Ramachandran, V.K., Prell, J., James, E.K., Scocchi, M., Ferguson, G.P., Poole, P.S., 2010. BacA is essential for bacteroid development in nodules of galegoid, but not phaseoloid, legumes. J. Bacteriol. 192, 2920–2928. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-10>
- Keet, J.-H., Ellis, A.G., Hui, C., Le Roux, J.J., 2017. Legume–rhizobium symbiotic promiscuity and effectiveness do not affect plant invasiveness. Ann. Bot. 119, 1319–1331. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx028>
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., Kecskés, M.L., 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biol. Biochem., Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference 36, 1229–1244. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.006>
- Kevei, Z., Vinardell, J.M., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2002. Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* spp. Mol. Plant-Microbe Interactions® 15, 922–931. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.922>
- Kim, M., Chen, Y., Xi, J., Waters, C., Chen, R., Wang, D., 2015a. An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 15238–15243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500123112>

- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Kondorosi, A., 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* MGG 193, 445–452. <https://doi.org/10.1007/BF00382082>
- Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, A., 1989. Positive and negative control of nod gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8, 1331–1340. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03513.x>
- Kondorosi, E., Kondorosi, A., 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* 567, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.075>
- Kondorosi, E., Mergaert, P., Kereszt, A., 2013. A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell differentiation of rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 611–628. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155630>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kryuchkova-Mostacci, N., Robinson-Rechavi, M., 2016. Tissue-specificity of gene expression diverges slowly between orthologs, and rapidly between paralogs. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1005274. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005274>
- Kühnle, N., Dederer, V., Lemberg, M.K., 2019. Intramembrane proteolysis at a glance: from signalling to protein degradation. *J. Cell Sci.* 132. <https://doi.org/10.1242/jcs.217745>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z.D., Tragiannidis, A., 2021. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens* 10, 373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 23, 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lavin, M., Herendeen, P.S., Wojciechowski, M.F., 2005. Evolutionary rates analysis of *Leguminosae* implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Syst. Biol.* 54, 575–594. <https://doi.org/10.1080/10635150590947131>

- Lavin, M., Pennington, R.T., Klitgaard, B.B., Sprent, J.I., de Lima, H.C., Gasson, P.E., 2001. The Dalbergioid legumes (*Fabaceae*): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *Am. J. Bot.* 88, 503–533.
- Lehnert, N., Dong, H.T., Harland, J.B., Hunt, A.P., White, C.J., 2018. Reversing nitrogen fixation. *Nat. Rev. Chem.* 2, 278–289. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0041-7>
- Lemberg, M.K., Martoglio, B., 2002. Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Molecular Cell* 10, 735–744. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00655-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00655-X)
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J., 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781–784. <https://doi.org/10.1038/344781a0>
- Lima, R.M., Kylarová, S., Mergaert, P., Kondorosi, É., 2020b. Unexplored arsenals of legume peptides with potential for their applications in medicine and agriculture. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01307>
- Lima, R.M., Rathod, B.B., Tiricz, H., Howan, D.H.O., Al Bouni, M.A., Jenei, S., Tímár, E., Endre, G., Tóth, G.K., Kondorosi, É., 2022. Legume plant peptides as sources of novel antimicrobial molecules against human pathogens. *Front. Mol. Biosci.* 9.
- Liu, J., Ma, K., Ciais, P., Polasky, S., 2016. Reducing human nitrogen use for food production. *Sci. Rep.* 6, 30104. <https://doi.org/10.1038/srep30104>
- Liu, J., Miller, S.S., Graham, M., Bucciarelli, B., Catalano, C.M., Sherrier, D.J., Samac, D.A., Ivashuta, S., Fedorova, M., Matsumoto, P., Gantt, J.S., Vance, C.P., 2006. Recruitment of novel calcium-binding proteins for root nodule symbiosis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141, 167–177. <https://doi.org/10.1104/pp.106.076711>
- Loureiro, M.F., Faria, S.M.D., James, E.K., Pott, A., Franco, A.A., 1994. Nitrogen-fixing stem nodules of the legume, *Discolobium pulchellum* Benth. *New Phytol.* 128, 283–295. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04012.x>
- Lu, S.H.-J., Jeon, A.H.W., Schmitt-Ulms, G., Qamar, S., Dodd, R., McDonald, B., Li, Y., Meadows, W., Cox, K., Bohm, C., Chen, F., Fraser, P., George-Hyslop, P.S., 2012. Vigilin interacts with signal peptide peptidase. *Proteome Sci.* 10, 33. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-33>
- Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y., Hayashi, M., 2008. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene

- silencing in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 21, 375–382.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-21-4-0375>
- Marlow, V.L., Haag, A.F., Kobayashi, H., Fletcher, V., Scocchi, M., Walker, G.C., Ferguson, G.P., 2009. Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 191, 1519–1527.
<https://doi.org/10.1128/JB.01661-08>
- Maróti, G., Kondorosi, É., 2014. Nitrogen-fixing rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00326>
- Martoglio, B., Dobberstein, B., 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8, 410–415. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01360-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01360-9)
- Martoglio, B., Graf, R., Dobberstein, B., 1997. Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO J.* 16, 6636–6645.
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6636>
- Marx, H., Minogue, C.E., Jayaraman, D., Richards, A.L., Kwiecien, N.W., Siahpirani, A.F., Rajasekar, S., Maeda, J., Garcia, K., Del Valle-Echevarria, A.R., Volkening, J.D., Westphall, M.S., Roy, S., Sussman, M.R., Ané, J.-M., Coon, J.J., 2016. A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nat. Biotechnol.* 34, 1198–1205.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3681>
- Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Velde, W.V. de, Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., Delacroix, H., Duc, G., Ratet, P., Aggerbeck, L., Kondorosi, E., Mergaert, P., 2010a. Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLOS ONE* 5, e9519.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009519>
- Mentrup, T., Loock, A.-C., Fluhrer, R., Schröder, B., 2017. Signal peptide peptidase and SPP-like proteases - Possible therapeutic targets? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology 1864, 2169–2182.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.007>
- Mergaert, P., 2018. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Nat. Prod. Rep.* 35, 336–356. <https://doi.org/10.1039/C7NP00056A>

- Mergaert, P., Kereszt, A., Kondorosi, E., 2020. Gene Expression in Nitrogen-Fixing Symbiotic nodule cells in *Medicago truncatula* and other nodulating plants. *Plant Cell* 32, 42–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00494>
- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2003a. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* 132, 161–173. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018192>
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.-E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the rhizobium–legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5230–5235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600912103>
- Mergaert, P., Van Montagu, M., Holsters, M., 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25, 811–817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi526.x>
- Mikuláss, K.R., Nagy, K., Bogos, B., Szegletes, Z., Kovács, E., Farkas, A., Váró, G., Kondorosi, É., Kereszt, A., 2016. Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides disturb the integrity of bacterial outer and inner membranes and cause loss of membrane potential. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0159-8>
- Milton, R.D., Cai, R., Abdellaoui, S., Leech, D., De Lacey, A.L., Pita, M., Minteer, S.D., 2017. Bioelectrochemical Haber–Bosch Process: An ammonia-producing H₂/N₂ fuel cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 2680–2683. <https://doi.org/10.1002/anie.201612500>
- Montiel, J., Downie, J.A., Farkas, A., Bihari, P., Herczeg, R., Bálint, B., Mergaert, P., Kereszt, A., Kondorosi, É., 2017b. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1704217114>
- Montiel, J., Szűcs, A., Boboescu, I.Z., Gherman, V.D., Kondorosi, É., Kereszt, A., 2016. Terminal bacteroid differentiation is associated with variable morphological changes in legume species belonging to the inverted repeat-lacking clade. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 29, 210–219. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0213-R>
- Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J.,

- Aravkin, A., Ashley, E., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Khorana, M., Kisson, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Mussi-Pinhata, M.M., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Olivás-Martínez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Peleg, A.Y., Perrone, C., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rudd, K.E., Russell, N., Schnall, J., Scott, J.A.G., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Turner, C., Turner, P., van Doorn, H.R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vu, H., Walsh, T., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wozniak, T., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nagy, K., Mikuláss, K.R., Végh, A.G., Kereszt, A., Kondorosi, É., Váró, G., Szegletes, Z., 2015. Interaction of cysteine-rich cationic antimicrobial peptides with intact bacteria and model membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* 34, 135–144. https://doi.org/10.4149/gpb_2015002
- Nagymihály, M., 2017. Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. <https://doi.org/10.14232/phd.4084>
- Nallu, S., Silverstein, K.A.T., Samac, D.A., Bucciarelli, B., Vance, C.P., VandenBosch, K.A., 2013. Regulatory patterns of a large family of defensin-like genes expressed in nodules of *Medicago truncatula*. *PLOS ONE* 8, e60355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060355>
- Neutzner, A., Neutzner, M., Benischke, A.-S., Ryu, S.-W., Frank, S., Youle, R.J., Karbowski, M., 2011. A systematic search for endoplasmic reticulum (ER) membrane-associated

- RING finger proteins identifies Nixin/ZNRF4 as a regulator of calnexin stability and ER homeostasis*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 8633–8643.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197459>
- Nouwen, N., Arrighi, J.-F., Cartieaux, F., Chaintreuil, C., Gully, D., Klopp, C., Giraud, E., 2017. The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in *Aeschynomene* /photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. *Sci. Rep.* 7, 448.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00559-0>
- Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., Downie, J.A., 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Oono, R., Denison, R.F., 2010b. Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* 154, 1541–1548.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.163436>
- Oono, R., Schmitt, I., Sprent, J.I., Denison, R.F., 2010. Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytol.* 187, 508–520.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03261.x>
- Ördögh, L., Vörös, A., Nagy, I., Kondorosi, É., Kereszt, A., 2014. Symbiotic plant peptides eliminate *Candida albicans* both *in vitro* and in an epithelial infection model and inhibit the proliferation of immortalized human cells. *BioMed Res. Int.* 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/320796>
- Penterman, J., Abo, R.P., De Nisco, N.J., Arnold, M.F.F., Longhi, R., Zanda, M., Walker, G.C., 2014. Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3561–3566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400450111>
- Pirtskhalava, M., Armstrong, A.A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E., Tartakovsky, M., 2021. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Res.* 49, D288–D297.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>

- Pislariu, C.I., D. Murray, J., Wen, J., Cosson, V., Muni, R.R.D., Wang, M., A. Benedito, V., Andriankaja, A., Cheng, X., Jerez, I.T., Mondy, S., Zhang, S., Taylor, M.E., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Chen, R., Udvardi, M.K., 2012. A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation1[W][OA]. *Plant Physiol.* 159, 1686–1699. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197061>
- Posch, A. (Ed.), 2008. 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation: Volume 2, Methods in Molecular Biology, 2D PAGE. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-210-0>
- Price, P.A., Tanner, H.R., Dillon, B.A., Shabab, M., Walker, G.C., Griffiths, J.S., 2015. Rhizobial peptidase HrrP cleaves host-encoded signaling peptides and mediates symbiotic compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15244–15249. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417797112>
- Pueppke, S.G., Broughton, W.J., 1999. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 12, 293–318. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.4.293>
- Qin, N., Xu, D., Li, J., Deng, X.W., 2020. COP9 signalosome: Discovery, conservation, activity, and function. *J. Integr. Plant Biol.* 62, 90–103. <https://doi.org/10.1111/jipb.12903>
- Raul, B., Bhattacharjee, O., Ghosh, A., Upadhyay, P., Tembhare, K., Singh, A., Shaheen, T., Ghosh, A.K., Torres-Jerez, I., Krom, N., Clevenger, J., Udvardi, M., Scheffler, B.E., Ozias-Akins, P., Sharma, R.D., Bandyopadhyay, K., Gaur, V., Kumar, S., Sinharoy, S., 2022. Microscopic and transcriptomic analyses of *Dalbergoid* legume peanut reveal a divergent evolution leading to Nod-factor-dependent epidermal crack-entry and terminal bacteroid differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 35, 131–145. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-21-0122-R>
- Ren, G., 2018. The evolution of determinate and indeterminate nodules within the *Papilionoideae* subfamily. Wageningen University. <https://doi.org/10.18174/429101>
- Ribeiro, C.W., Baldacci-Cresp, F., Pierre, O., Larousse, M., Benyamina, S., Lambert, A., Hopkins, J., Castella, C., Cazareth, J., Alloing, G., Boncompagni, E., Couturier, J., Mergaert, P., Gamas, P., Rouhier, N., Montrichard, F., Frenedo, P., 2017. Regulation of differentiation of nitrogen-fixing bacteria by microsymbiont targeting of plant thioredoxin s1. *Curr. Biol.* 27, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.013>

- Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., Swift, S., 2019. Optimisation of the protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Front. Microbiol.* 10.
- Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A., Kondorosi, A., 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1757–1761. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.6.1757>
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., Carvalho-Niebel, F. de, Gouzy, J., Bruand, C., Gamas, P., 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77, 817–837. <https://doi.org/10.1111/tpj.12442>
- Satgé, C., Moreau, S., Sallet, E., Lefort, G., Auriac, M.-C., Remblière, C., Cottret, L., Gallardo, K., Noirot, C., Jardinaud, M.-F., Gamas, P., 2016. Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. *Nat. Plants* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.166>
- Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Röser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R.A., Broughton, W.J., Perret, X., Strittmatter, A.W., Streit, W.R., 2009. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4035–4045. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-09>
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizer, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D., Kondorosi, A., 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 192–196. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.192>
- Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., Dean, D.R., 2009. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 701–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812>
- Shabab, M., Arnold, M.F.F., Penterman, J., Wommack, A.J., Bocker, H.T., Price, P.A., Griffiths, J.S., Nolan, E.M., Walker, G.C., 2016. Disulfide cross-linking influences symbiotic activities of nodule peptide NCR247. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 10157–10162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610724113>
- Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Bandyopadhyay, K., Kereszt, A., Pislariu, C.I., Nakashima, J., Benedito, V.A., Kondorosi, E., Udvardi, M.K., 2013. The C2H2 transcription factor

- REGULATOR OF SYMBIOSOME DIFFERENTIATION represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 25, 3584–3601.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.114017>
- Skawińska, M., Łotocka, B., Ruszkowski, T., Banaszczak, P., Znojek, E., 2017. Root nodule structure in *Chamaecytisus podolicus*. *Acta Agrobot.* 70.
<https://doi.org/10.5586/aa.1716>
- Smil, V., 2002. Eating meat: evolution, patterns, and consequences. *Popul. Dev. Rev.* 28, 599–639. <https://doi.org/10.1111/j.1728-4457.2002.00599.x>
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Morgan, D.R., Swensen, S.M., Mullin, B.C., Dowd, J.M., Martin, P.G., 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2647–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2647>
- Sprent, J.I., 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 174, 11–25.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x>
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., Pisante, M., 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 2.
<https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Steele, K.P., Ickert-Bond, S.M., Zarre, S., Wojciechowski, M.F., 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (*Leguminosae*): Evidence from analyses of plastid trnK/matK and nuclear GA3ox1 sequences. *Am. J. Bot.* 97, 1142–1155.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000009>
- Szerencsés, B., Gácsér, A., Endre, G., Domonkos, I., Tiricz, H., Vágvölgyi, C., Szolomajer, J., Howan, D.H.O., Tóth, G.K., Pfeiffer, I., Kondorosi, É., 2021. Symbiotic NCR peptide fragments affect the viability, morphology and biofilm formation of *Candida* species. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3666. <https://doi.org/10.3390/ijms22073666>
- Tarr, D.E.K., 2016. Establishing a reference array for the CS- $\alpha\beta$ superfamily of defensive peptides. *BMC Res. Notes* 9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2291-0>
- Teamtisong, K., Songwattana, P., Noisangiam, R., Piromyou, P., Boonkerd, N., Tittabutr, P., Minamisawa, K., Nantagij, A., Okazaki, S., Abe, M., Uchiumi, T., Teaumroong, N., 2014. Divergent nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. *Microbes Environ.* 29, 370–376.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14065>

- Tetlow, I.J., Emes, M.J., 2014. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* 66, 546–558. <https://doi.org/10.1002/iub.1297>
- Tiricz, H., Szűcs, A., Farkas, A., Pap, B., Lima, R.M., Maróti, G., Kondorosi, É., Kereszt, A., 2013. Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6737–6746. <https://doi.org/10.1128/AEM.01791-13>
- Udvardi, M., Poole, P.S., 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 781–805. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E., Mergaert, P., 2010. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327, 1122–1126. <https://doi.org/10.1126/science.1184057>
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- van Velzen, R., Doyle, J.J., Geurts, R., 2019. A resurrected scenario: single gain and massive loss of nitrogen-fixing nodulation. *Trends Plant Sci.* 24, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.005>
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15, 2093–2105. <https://doi.org/10.1105/tpc.014373>
- Vishnepolsky, B., Pirtskhalava, M., 2014. Prediction of linear cationic antimicrobial peptides based on characteristics responsible for their interaction with the membranes. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 1512–1523. <https://doi.org/10.1021/ci4007003>
- Voss, M., Schröder, B., Fluhrer, R., 2013. Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Intramembrane Proteases* 1828, 2828–2839. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.033>

- Wang, G., 2020. The antimicrobial peptide database provides a platform for decoding the design principles of naturally occurring antimicrobial peptides. *Protein Sci.* 29, 8–18. <https://doi.org/10.1002/pro.3702>
- Wang, K., Smith, D., és Zheng, Y., 2018. „Electron-driven heterogeneous catalytic synthesis of ammonia: current states and perspective”. *Carbon Resources Conversion* 1. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.06.004>.
- Wang, X., Ni, W., Ge, X., Zhang, J., Ma, H., Cao, K., 2006. Proteomic identification of potential target proteins regulated by an ASK1-mediated proteolysis pathway. *Cell Res.* 16, 489–498. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310060>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Williams, E.J.B., Pal, C., Hurst, L.D., 2000. The molecular evolution of signal peptides. *Gene* 253, 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00233-X)
- Wojciechowski, M.F., Lavin, M., Sanderson, M.J., 2004. A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91, 1846–1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Wojciechowski, M.F., Sanderson, M.J., Steele, K.P., Liston, A., n.d. MOLECULAR PHYLOGENY OF THE “TEMPERATE HERBACEOUS TRIBES” OF PAPILIONOID LEGUMES: A SUPERTREE APPROACH. *Adv. Legume Syst.* 22.
- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., Bisseling, T., 2014. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* 141, 3517–3528. <https://doi.org/10.1242/dev.110775>
- Zhang, S., Wang, T., Lima, R.M., Pettkó-Szandtner, A., Kereszt, A., Downie, J.A., Kondorosi, E., 2023. Widely conserved AHL transcription factors are essential for NCR gene expression and nodule development in *Medicago*. *Nat. Plants* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01326-4>

FÜGGELÉKEK

1. függelék. Primerlista.

40S: RT-qPCR belső kontroll, Ljubq10prom: a *L. japonicus ubiquitin 10* promóter, nodSPP: gümőspezifikus szignál peptid peptidáz, genSPP: általános szignál peptid peptidáz, nodSPP_GW_RNSi: a nodSPP RNSi konstrukció létrehozásához szükséges nodSPP-specifikus gateway primerek.

Primer neve	Primer szekvenciája
40S_qPCR_F	CCGCAAGGACTGTTCAAGAT
40S_qPCR_R	TATCGGTCCATTCTGGAAGC
Ljubq10prom_F	CGTCACTAGTTGCGTGTGGT
Ljubq10prom_R	GAAATTAACAAACCGCCAACA
nodSPP_qPCR_F	TTTGGCTGCTCACTGTATCTGG
nodSPP_qPCR_R	TCAGATGATTTGGCCGTCTTCG
genSPP_qPCR_F	CCGATGCTTCTGATTCCTG
genSPP_qPCR_R	TTACAGAGGTGTGCTGCTGAA
nodSPP_GW_RNSi_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTTAACCTTAGCACCTCTTGT
nodSPP_GW_RNSi_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATGGTAGTAATGTIGCCGATA

2. függelék. A csendesítéshez használt nodSPP szekvencia (285 bp).

TTTAACCTTAGCACCTCTTGTGTGAAGATAAATCCAAATCTAAATGTTATCTTGA
 CTGCTTGCATCACTGTGTTTGTGGGATGCTATCGTTCCGTCAAACCAACTCCTCCT
 TCTGAGACAATGTCCAACGAACATGCCATGCGTTTTCCCTTTGTTGGGAGTGCAA
 TGTTATTACTACTTTTCTTGCTCTTCAAGTTTCTAT

3. függelék. Szintetikus szignál peptidek szekvenciája

A szignál peptidek (SP-k) egy N-terminális, hibásan szintetizált StrepII-taget és egy C-terminális HA-taget tartalmaznak. Az SP szekvenciája ki van emelve.

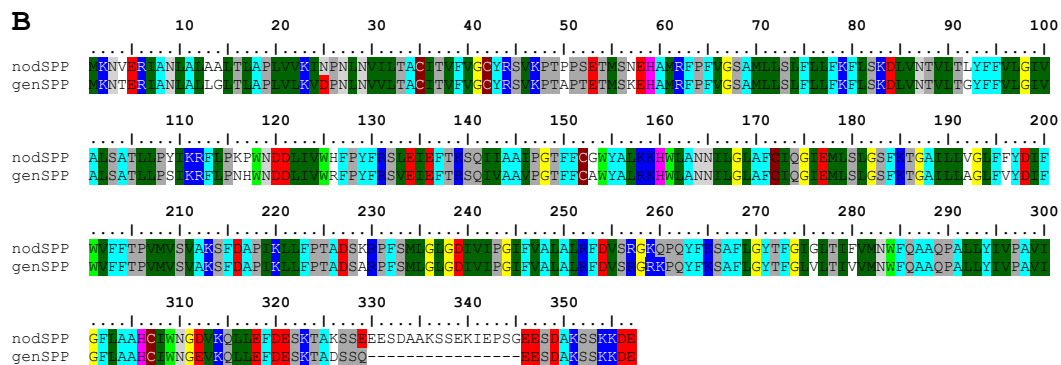
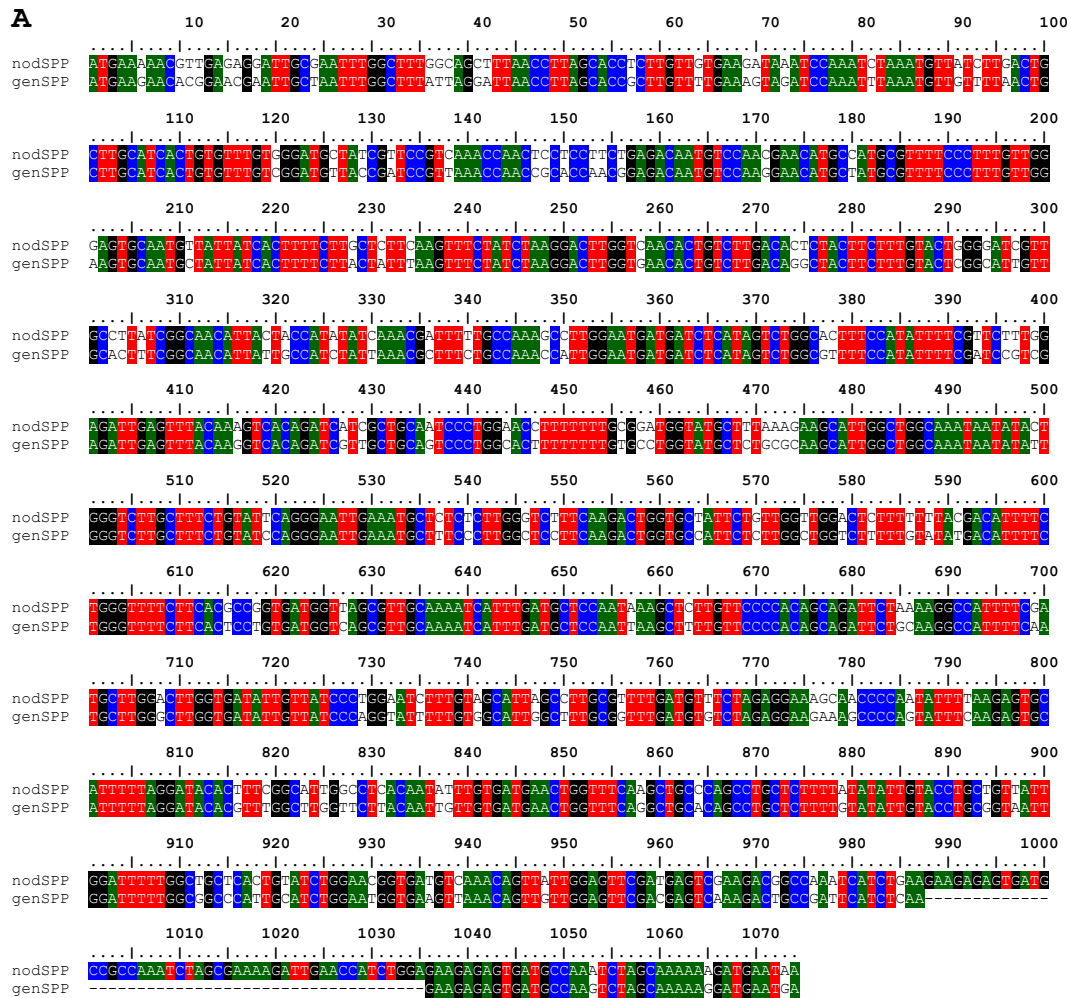
Peptid neve	Peptid szekvenciája
HA	YPYDVDPDYA
NCR120 SP	WSHPQFEKMAKFNFNVYSMIIFLSLLVVA YPYDVDPDYA
NCR216 SP	WSHPQFEKMTTILKFAYVMIICLFLQVAA YPYDVDPDYA
NCR247 SP	WSHPQFEKMDKIHKFIYALIFFLALFLVVA YPYDVDPDY
NCR252 SP	WSHPQFEKMNIIFKCVYHMIVILLVATEA YPYDVDPDYA
Nod25 SP	WSHPQFEKMVYSNSYMFGLGLGVFVLLSSHVLA YPYDVDPDYA
CaML2 SP	WSHPQFEKMAYSLSYFLGLNLFVFLSFEVLA YPYDVDPDYA
StrepII	WSHPQFEK

4. függelék. A 278 NCR promóterben jelen lévő négyes motívum és az NCR169 promóterben AT gazdag, az AHL fehérjék kötésére szolgáló motívum szekvenciája.

A: adenin, C: citozin, G: guanin, T: timin, D: A vagy G vagy T, R: A vagy G, Y: C vagy T, W: A vagy T.

Promóter-motívum	Promóter-motívum szekvenciája
Négyes motívum	TWARAGAYATTTAAAYAATDATTYTAATTTTADRAADRDTTT
NCR169 promóterben lévő négyes motívum	AAAGAGACATTTAATAATTATTTTAATTTTCAAAAAGTATT

5. függelék. A nodSPP és a genSPP szekvenciaillesztése, nukleotid- (A) és fehérjeszekvenciák (B) alapján.
A homológ nukleotidok (A), illetve aminosavak (B) színessel vannak jelölve. Illesztőprogram: MEGA-X.



Medtr1g110220		Medtr3g479460	Medtr4g108680				Medtr8g469860	
Medtr1g110230			Medtr4g108760				Medtr8g469980	
Medtr1g110270			Medtr4g108880				Medtr8g470080	
Medtr1g110550			Medtr4g109150				Medtr8g479260	
Medtr1g110790			Medtr4g109170				Medtr8g479360	
Medtr1g110820			Medtr4g109360				Medtr8g479430	
Medtr1g111280			Medtr4g109830				Medtr8g479450	
Medtr1g111330			Medtr4g109880					
Medtr1g111510			Medtr4g109900					
Medtr1g111530			Medtr4g112360					
Medtr1g111540			Medtr4g112430					
Medtr1g111550			Medtr4g112440					
Medtr1g112630			Medtr4g113620					
Medtr1g112660			Medtr4g113710					
Medtr1g112780			Medtr4g114240					
Medtr1g112830			Medtr4g114340					
Medtr1g112940			Medtr4g114640					
Medtr1g113960			Medtr4g115330					
Medtr1g114340			Medtr4g115970					
Medtr1g114510			Medtr4g116040					
Medtr1g114540			Medtr4g116420					
Medtr1g115170			Medtr4g116440					
Medtr1g115345			Medtr4g116540					
Medtr1g115390			Medtr4g117020					
Medtr1g115400			Medtr4g117090					
Medtr1g115485			Medtr4g117120					
Medtr1g115840			Medtr4g117250					
Medtr1g115850			Medtr4g117390					
Medtr1g115980			Medtr4g117400					
Medtr1g116290			Medtr4g117450					
Medtr1g116790			Medtr4g117720					
Medtr1g116970			Medtr4g117960					
Medtr1g117030			Medtr4g118020					
Medtr1g471070			Medtr4g118570					
Medtr1g475250			Medtr4g118590					
Medtr1g484830			Medtr4g118800					
Medtr1g492640			Medtr4g118885					
Medtr1g492660			Medtr4g119410					
			Medtr4g119422					
			Medtr4g119780					
			Medtr4g119930					
			Medtr4g120270					
			Medtr4g121460					
			Medtr4g121570					
			Medtr4g122260					
			Medtr4g122640					
			Medtr4g122800					
			Medtr4g123040					
			Medtr4g123850					
			Medtr4g123870					
			Medtr4g123990					
			Medtr4g124000					
			Medtr4g124040					
			Medtr4g124190					
			Medtr4g124220					
			Medtr4g124470					
			Medtr4g124520					
			Medtr4g124800					
			Medtr4g124855					
			Medtr4g125700					
			Medtr4g125930					
			Medtr4g126000					
			Medtr4g126160					
			Medtr4g126210					
			Medtr4g126900					
			Medtr4g126970					
			Medtr4g127530					

			Medtr4g127680					
			Medtr4g127900					
			Medtr4g128310					
			Medtr4g128750					
			Medtr4g129270					
			Medtr4g129690					
			Medtr4g130270					
			Medtr4g130907					
			Medtr4g130920					
			Medtr4g130970					
			Medtr4g132110					
			Medtr4g132430					
			Medtr4g133440					
			Medtr4g133620					
			Medtr4g133932					
			Medtr4g134130					
			Medtr4g134140					
			Medtr4g134280					
			Medtr4g134320					
			Medtr4g134370					
			Medtr4g415070					
			Medtr4g415390					
			Medtr4g478130					
			Medtr4g478180					
			Medtr4g485550					
			Medtr4g485640					

7. függelék. A nodSPP RNSi gümöben legalább kétszeresen downregulált gének listája.
3130 darab gén, p érték<0,05.

Medtr1g004980	Medtr2g005410	Medtr3g005710	Medtr4g005070	Medtr5g004620	Medtr6g004000	Medtr7g005400	Medtr8g005325	Medtr0003s0130
Medtr1g004990	Medtr2g005810	Medtr3g005790	Medtr4g005320	Medtr5g004650	Medtr6g004280	Medtr7g005930	Medtr8g006735	Medtr0003s0190
Medtr1g006490	Medtr2g005870	Medtr3g006370	Medtr4g006080	Medtr5g004830	Medtr6g004520	Medtr7g006900	Medtr8g006745	Medtr0003s0210
Medtr1g007540	Medtr2g006280	Medtr3g006380	Medtr4g007070	Medtr5g004980	Medtr6g004670	Medtr7g007340	Medtr8g006765	Medtr0003s0560
Medtr1g007580	Medtr2g006360	Medtr3g006650	Medtr4g007080	Medtr5g005290	Medtr6g005250	Medtr7g007490	Medtr8g006775	Medtr0004s0300
Medtr1g008140	Medtr2g007210	Medtr3g008445	Medtr4g007090	Medtr5g005430	Medtr6g005480	Medtr7g007770	Medtr8g006780	Medtr0009s0390
Medtr1g008280	Medtr2g008160	Medtr3g008760	Medtr4g007095	Medtr5g005570	Medtr6g006220	Medtr7g007810	Medtr8g006935	Medtr0009s0400
Medtr1g008380	Medtr2g008170	Medtr3g008800	Medtr4g007220	Medtr5g005770	Medtr6g006240	Medtr7g007940	Medtr8g007235	Medtr0011s0280
Medtr1g009030	Medtr2g008560	Medtr3g008960	Medtr4g007240	Medtr5g006360	Medtr6g006250	Medtr7g008020	Medtr8g007300	Medtr0014s0490
Medtr1g009260	Medtr2g008610	Medtr3g009180	Medtr4g007740	Medtr5g006370	Medtr6g006275	Medtr7g008070	Medtr8g007380	Medtr0015s0130
Medtr1g009310	Medtr2g008770	Medtr3g010490	Medtr4g008050	Medtr5g006400	Medtr6g006500	Medtr7g008970	Medtr8g008840	Medtr0015s0230
Medtr1g009740	Medtr2g008880	Medtr3g010820	Medtr4g008820	Medtr5g006430	Medtr6g007470	Medtr7g008985	Medtr8g009535	Medtr0017s0100
Medtr1g009750	Medtr2g008910	Medtr3g010870	Medtr4g009710	Medtr5g006795	Medtr6g007687	Medtr7g009040	Medtr8g009640	Medtr0019s0020
Medtr1g009760	Medtr2g009220	Medtr3g010970	Medtr4g009810	Medtr5g008040	Medtr6g007697	Medtr7g009060	Medtr8g009840	Medtr0024s0310
Medtr1g009900	Medtr2g009340	Medtr3g011830	Medtr4g009960	Medtr5g010390	Medtr6g008170	Medtr7g009270	Medtr8g009880	Medtr0025s0110
Medtr1g010140	Medtr2g009720	Medtr3g011890	Medtr4g010340	Medtr5g010440	Medtr6g008480	Medtr7g009395	Medtr8g009980	Medtr0027s0010
Medtr1g010270	Medtr2g009770	Medtr3g012140	Medtr4g010920	Medtr5g010750	Medtr6g008630	Medtr7g010020	Medtr8g010040	Medtr0027s0180
Medtr1g010310	Medtr2g009910	Medtr3g012160	Medtr4g010980	Medtr5g011750	Medtr6g008690	Medtr7g010200	Medtr8g010230	Medtr0027s0200
Medtr1g011340	Medtr2g010200	Medtr3g012370	Medtr4g011120	Medtr5g011770	Medtr6g008800	Medtr7g010440	Medtr8g011180	Medtr0032s0080
Medtr1g011415	Medtr2g010520	Medtr3g013660	Medtr4g011190	Medtr5g011950	Medtr6g008820	Medtr7g010950	Medtr8g011210	Medtr0032s0170
Medtr1g011540	Medtr2g010815	Medtr3g013700	Medtr4g011330	Medtr5g012130	Medtr6g009070	Medtr7g011060	Medtr8g011440	Medtr0034s0170
Medtr1g012620	Medtr2g010820	Medtr3g014250	Medtr4g011500	Medtr5g012140	Medtr6g009110	Medtr7g011480	Medtr8g011470	Medtr0036s0110
Medtr1g012960	Medtr2g011590	Medtr3g014260	Medtr4g011510	Medtr5g012210	Medtr6g009440	Medtr7g011663	Medtr8g011730	Medtr0036s0320
Medtr1g013050	Medtr2g011690	Medtr3g014290	Medtr4g011690	Medtr5g012270	Medtr6g009553	Medtr7g011770	Medtr8g012290	Medtr0040s0030
Medtr1g013320	Medtr2g011760	Medtr3g014660	Medtr4g012430	Medtr5g013320	Medtr6g009720	Medtr7g012260	Medtr8g012585	Medtr0042s0040
Medtr1g013410	Medtr2g012990	Medtr3g014695	Medtr4g012610	Medtr5g013910	Medtr6g009770	Medtr7g013300	Medtr8g012590	Medtr0045s0060
Medtr1g014420	Medtr2g013070	Medtr3g014705	Medtr4g013090	Medtr5g014085	Medtr6g011200	Medtr7g014230	Medtr8g012595	Medtr0045s0110
Medtr1g015000	Medtr2g013080	Medtr3g014770	Medtr4g013245	Medtr5g014100	Medtr6g011290	Medtr7g014250	Medtr8g012635	Medtr0048s0180
Medtr1g015275	Medtr2g013370	Medtr3g015665	Medtr4g013270	Medtr5g014150	Medtr6g011410	Medtr7g014330	Medtr8g012660	Medtr0050s0240
Medtr1g015300	Medtr2g013970	Medtr3g015845	Medtr4g013330	Medtr5g014600	Medtr6g011490	Medtr7g014360	Medtr8g012675	Medtr0063s0100
Medtr1g015410	Medtr2g014460	Medtr3g015870	Medtr4g014160	Medtr5g014840	Medtr6g011530	Medtr7g015880	Medtr8g012680	Medtr0077s0010
Medtr1g016620	Medtr2g015470	Medtr3g015877	Medtr4g014470	Medtr5g015090	Medtr6g011610	Medtr7g015970	Medtr8g012700	Medtr0086s0010
Medtr1g016850	Medtr2g015480	Medtr3g016020	Medtr4g014790	Medtr5g015290	Medtr6g011810	Medtr7g016060	Medtr8g012730	Medtr0093s0090
Medtr1g017170	Medtr2g015760	Medtr3g016090	Medtr4g015700	Medtr5g015530	Medtr6g012980	Medtr7g016440	Medtr8g012735	Medtr0094s0020

Medtr1g100667	Medtr2g097520	Medtr3g101470	Medtr4g094352	Medtr5g082480		Medtr7g096090	Medtr8g463760	
Medtr1g100783	Medtr2g097580	Medtr3g102180	Medtr4g094360	Medtr5g082570		Medtr7g096440	Medtr8g464260	
Medtr1g100787	Medtr2g097700	Medtr3g102530	Medtr4g094450	Medtr5g082760		Medtr7g096610	Medtr8g465040	
Medtr1g101950	Medtr2g098310	Medtr3g102600	Medtr4g094595	Medtr5g082850		Medtr7g096870	Medtr8g465280	
Medtr1g101970	Medtr2g098490	Medtr3g102650	Medtr4g094715	Medtr5g083030		Medtr7g097030	Medtr8g466180	
Medtr1g102010	Medtr2g098600	Medtr3g102670	Medtr4g094882	Medtr5g083110		Medtr7g098160	Medtr8g466800	
Medtr1g102070	Medtr2g099010	Medtr3g102810	Medtr4g094885	Medtr5g083250		Medtr7g098180	Medtr8g467170	
Medtr1g102230	Medtr2g099175	Medtr3g103330	Medtr4g094925	Medtr5g083255		Medtr7g098190	Medtr8g468060	
Medtr1g102350	Medtr2g099790	Medtr3g103400	Medtr4g094958	Medtr5g083810		Medtr7g098220	Medtr8g468070	
Medtr1g102750	Medtr2g099810	Medtr3g103440	Medtr4g095075	Medtr5g084000		Medtr7g098230	Medtr8g468790	
Medtr1g102820	Medtr2g100290	Medtr3g103570	Medtr4g095280	Medtr5g084020		Medtr7g098610	Medtr8g468940	
Medtr1g103050	Medtr2g100340	Medtr3g103590	Medtr4g095440	Medtr5g084260		Medtr7g098680	Medtr8g469310	
Medtr1g103060	Medtr2g100350	Medtr3g104400	Medtr4g095600	Medtr5g084680		Medtr7g098880	Medtr8g470010	
Medtr1g103070	Medtr2g100710	Medtr3g104880	Medtr4g097080	Medtr5g084770		Medtr7g098890	Medtr8g471060	
Medtr1g103500	Medtr2g101130	Medtr3g104930	Medtr4g097380	Medtr5g084950		Medtr7g099160	Medtr8g473930	
Medtr1g103540	Medtr2g101410	Medtr3g104990	Medtr4g097440	Medtr5g085200		Medtr7g099220		
Medtr1g103640	Medtr2g101840	Medtr3g105210	Medtr4g097470	Medtr5g085730		Medtr7g099260		
Medtr1g103690	Medtr2g102030	Medtr3g105550	Medtr4g097650	Medtr5g086360		Medtr7g099265		
Medtr1g103850	Medtr2g102140	Medtr3g105590	Medtr4g097670	Medtr5g087340		Medtr7g099270		
Medtr1g104500	Medtr2g102340	Medtr3g105690	Medtr4g097700	Medtr5g087740		Medtr7g099330		
Medtr1g104650	Medtr2g102730	Medtr3g106000	Medtr4g098035	Medtr5g087820		Medtr7g099570		
Medtr1g104780	Medtr2g103140	Medtr3g106030	Medtr4g098490	Medtr5g088350		Medtr7g099820		
Medtr1g105010	Medtr2g103303	Medtr3g106140	Medtr4g098500	Medtr5g089100		Medtr7g099850		
Medtr1g105075	Medtr2g103307	Medtr3g106290	Medtr4g098800	Medtr5g089160		Medtr7g099870		
Medtr1g105360	Medtr2g103330	Medtr3g106520	Medtr4g098850	Medtr5g089170		Medtr7g100050		
Medtr1g105480	Medtr2g103340	Medtr3g107100	Medtr4g098870	Medtr5g089310		Medtr7g100335		
Medtr1g105495	Medtr2g103360	Medtr3g107630	Medtr4g099150	Medtr5g089380		Medtr7g100530		
Medtr1g106080	Medtr2g103590	Medtr3g108190	Medtr4g099270	Medtr5g089450		Medtr7g100540		
Medtr1g106420	Medtr2g103670	Medtr3g108730	Medtr4g099310	Medtr5g089870		Medtr7g100860		
Medtr1g106735	Medtr2g103750	Medtr3g108990	Medtr4g099430	Medtr5g090100		Medtr7g101170		
Medtr1g106860	Medtr2g104100	Medtr3g109160	Medtr4g100530	Medtr5g090280		Medtr7g101310		
Medtr1g107055	Medtr2g104220	Medtr3g109250	Medtr4g100550	Medtr5g090340		Medtr7g102155		
Medtr1g107285	Medtr2g104490	Medtr3g109520	Medtr4g100590	Medtr5g090550		Medtr7g102160		
Medtr1g109410	Medtr2g104570	Medtr3g109820	Medtr4g100690	Medtr5g090630		Medtr7g102260		
Medtr1g110280	Medtr2g105390	Medtr3g109932	Medtr4g100880	Medtr5g091180		Medtr7g102450		
Medtr1g110590	Medtr2g105720	Medtr3g109972	Medtr4g101245	Medtr5g091650		Medtr7g102465		
Medtr1g110880	Medtr2g106070	Medtr3g110088	Medtr4g101330	Medtr5g091690		Medtr7g102805		
Medtr1g111850	Medtr2g106350	Medtr3g110138	Medtr4g101600	Medtr5g093090		Medtr7g102806		
Medtr1g112300	Medtr2g106390	Medtr3g110175	Medtr4g101870	Medtr5g093180		Medtr7g103340		
Medtr1g112350	Medtr2g106310	Medtr3g110182	Medtr4g102400	Medtr5g095400		Medtr7g103390		
Medtr1g112700	Medtr2g106530	Medtr3g110195	Medtr4g102470	Medtr5g095460		Medtr7g103440		
Medtr1g112750	Medtr2g106370	Medtr3g110205	Medtr4g103450	Medtr5g095490		Medtr7g103610		
Medtr1g112850	Medtr2g106370	Medtr3g110395	Medtr4g103480	Medtr5g095580		Medtr7g103620		
Medtr1g114150	Medtr2g106370	Medtr3g110720	Medtr4g103490	Medtr5g095590		Medtr7g104080		
Medtr1g114640	Medtr2g106370	Medtr3g110840	Medtr4g103495	Medtr5g095595		Medtr7g105260		
Medtr1g115130	Medtr2g106370	Medtr3g110900	Medtr4g103565	Medtr5g095620		Medtr7g105460		
Medtr1g115140	Medtr2g106370	Medtr3g111020	Medtr4g103800	Medtr5g096760		Medtr7g105550		
Medtr1g115175	Medtr2g106380	Medtr3g111260	Medtr4g103850	Medtr5g097010		Medtr7g105560		
Medtr1g115210	Medtr2g1063240	Medtr3g111270	Medtr4g103910	Medtr5g097150		Medtr7g105570		
Medtr1g115455	Medtr2g106380	Medtr3g111880	Medtr4g103920	Medtr5g097220		Medtr7g105790		
Medtr1g115490	Medtr2g106380	Medtr3g111920	Medtr4g103930	Medtr5g097300		Medtr7g105850		
Medtr1g115520	Medtr2g106380	Medtr3g111940	Medtr4g103970	Medtr5g097320		Medtr7g105890		
Medtr1g115590	Medtr2g106380	Medtr3g111950	Medtr4g104410	Medtr5g097420		Medtr7g106320		
Medtr1g116000	Medtr2g106380	Medtr3g112060	Medtr4g104530	Medtr5g098020		Medtr7g106500		
Medtr1g116070	Medtr2g106380	Medtr3g112070	Medtr4g104680	Medtr5g098060		Medtr7g106600		
Medtr1g116550	Medtr2g106380	Medtr3g112100	Medtr4g104760	Medtr5g098800		Medtr7g106620		
Medtr1g116580	Medtr2g106380	Medtr3g112130	Medtr4g104770	Medtr5g099030		Medtr7g106750		
Medtr1g116930	Medtr2g106380	Medtr3g112140	Medtr4g104860	Medtr5g10459510		Medtr7g107100		
Medtr1g418505	Medtr2g460960	Medtr3g112170	Medtr4g105310			Medtr7g107160		
Medtr1g492760	Medtr2g461020	Medtr3g112180	Medtr4g105430			Medtr7g107210		
Medtr1g492790	Medtr2g461270	Medtr3g112210	Medtr4g105690			Medtr7g107670		
Medtr1g492930	Medtr2g461290	Medtr3g112290	Medtr4g106630			Medtr7g107680		
	Medtr2g461570	Medtr3g112350	Medtr4g106790			Medtr7g108290		
	Medtr2g481150	Medtr3g112460	Medtr4g106800			Medtr7g108560		
	Medtr2g481160	Medtr3g112480	Medtr4g106930			Medtr7g108620		
		Medtr3g113040	Medtr4g107040			Medtr7g109210		
		Medtr3g113270	Medtr4g107230			Medtr7g109230		

		Medtr3g113310	Medtr4g107370			Medtr7g109360		
		Medtr3g113788	Medtr4g107460			Medtr7g109440		
		Medtr3g114300	Medtr4g107620			Medtr7g109490		
		Medtr3g114500	Medtr4g107630			Medtr7g109540		
		Medtr3g115120	Medtr4g108170			Medtr7g109920		
		Medtr3g115340	Medtr4g108180			Medtr7g110180		
		Medtr3g115450	Medtr4g108230			Medtr7g110310		
		Medtr3g115540	Medtr4g108330			Medtr7g110370		
		Medtr3g115940	Medtr4g109090			Medtr7g110900		
		Medtr3g116410	Medtr4g109340			Medtr7g111110		
		Medtr3g116430	Medtr4g109600			Medtr7g111260		
		Medtr3g116770	Medtr4g109920			Medtr7g112120		
		Medtr3g116990	Medtr4g109980			Medtr7g112330		
		Medtr3g117050	Medtr4g110040			Medtr7g112750		
		Medtr3g117120	Medtr4g110130			Medtr7g113250		
		Medtr3g117160	Medtr4g111770			Medtr7g113280		
		Medtr3g117280	Medtr4g112025			Medtr7g113320		
		Medtr3g117500	Medtr4g112350			Medtr7g113490		
		Medtr3g117590	Medtr4g113100			Medtr7g113830		
		Medtr3g117680	Medtr4g113530			Medtr7g113930		
		Medtr3g117750	Medtr4g113630			Medtr7g114090		
		Medtr3g117800	Medtr4g113680			Medtr7g114220		
		Medtr3g118530	Medtr4g114120			Medtr7g114550		
		Medtr3g415600	Medtr4g114210			Medtr7g114870		
		Medtr3g435430	Medtr4g114960			Medtr7g114890		
		Medtr3g435480	Medtr4g115360			Medtr7g114895		
		Medtr3g436100	Medtr4g115620			Medtr7g114960		
		Medtr3g436500	Medtr4g115820			Medtr7g115410		
		Medtr3g436830	Medtr4g116360			Medtr7g115700		
		Medtr3g436990	Medtr4g116500			Medtr7g116520		
		Medtr3g437580	Medtr4g117050			Medtr7g116710		
		Medtr3g438070	Medtr4g117060			Medtr7g116795		
		Medtr3g438210	Medtr4g117660			Medtr7g117355		
		Medtr3g450800	Medtr4g117800			Medtr7g117430		
		Medtr3g451370	Medtr4g117890			Medtr7g117505		
		Medtr3g451530	Medtr4g117950			Medtr7g117700		
		Medtr3g451540	Medtr4g118350			Medtr7g117750		
		Medtr3g452730	Medtr4g118355			Medtr7g118130		
		Medtr3g460810	Medtr4g118770			Medtr7g118330		
		Medtr3g460850	Medtr4g118840			Medtr7g405770		
		Medtr3g462870	Medtr4g119030			Medtr7g406830		
		Medtr3g462950	Medtr4g119270			Medtr7g406840		
		Medtr3g462970	Medtr4g119860			Medtr7g406940		
		Medtr3g463270	Medtr4g119910			Medtr7g445340		
		Medtr3g463450	Medtr4g120050			Medtr7g445930		
		Medtr3g463700	Medtr4g120420			Medtr7g451010		
		Medtr3g464330	Medtr4g120460			Medtr7g451710		
		Medtr3g464570	Medtr4g120750			Medtr7g451770		
		Medtr3g464580	Medtr4g120800			Medtr7g451800		
		Medtr3g464720	Medtr4g120830			Medtr7g458880		
		Medtr3g465410	Medtr4g121090			Medtr7g470610		
		Medtr3g465420	Medtr4g122740					
		Medtr3g465550	Medtr4g122750					
		Medtr3g465930	Medtr4g122760					
		Medtr3g466410	Medtr4g122930					
		Medtr3g466460	Medtr4g123790					
		Medtr3g467460	Medtr4g123940					
		Medtr3g467470	Medtr4g123950					
		Medtr3g467490	Medtr4g124400					
		Medtr3g467550	Medtr4g124790					
		Medtr3g467600	Medtr4g124820					
			Medtr4g124850					
			Medtr4g124930					
			Medtr4g125015					
			Medtr4g125180					
			Medtr4g125670					
			Medtr4g125940					

			Medtr4g126270					
			Medtr4g126770					
			Medtr4g126950					
			Medtr4g127140					
			Medtr4g127290					
			Medtr4g127310					
			Medtr4g127360					
			Medtr4g127610					
			Medtr4g127620					
			Medtr4g128160					
			Medtr4g128320					
			Medtr4g128540					
			Medtr4g128770					
			Medtr4g128930					
			Medtr4g129020					
			Medtr4g129420					
			Medtr4g129760					
			Medtr4g129920					
			Medtr4g130220					
			Medtr4g130300					
			Medtr4g130780					
			Medtr4g131180					
			Medtr4g131580					
			Medtr4g131840					
			Medtr4g131870					
			Medtr4g131940					
			Medtr4g132020					
			Medtr4g132090					
			Medtr4g132400					
			Medtr4g132840					
			Medtr4g132980					
			Medtr4g133110					
			Medtr4g133450					
			Medtr4g133600					
			Medtr4g133690					
			Medtr4g133750					
			Medtr4g133760					
			Medtr4g133890					
			Medtr4g133900					
			Medtr4g133970					
			Medtr4g134190					
			Medtr4g134780					
			Medtr4g415300					
			Medtr4g435277					
			Medtr4g435298					

