

# PH.D. ÉRTEKEZÉS

Bozsóki Zoltán

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS  
INFORMATIKAI KAR

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI  
KUTATÓKÖZPONT  
GENETIKAI INTÉZET

2017  
SZEGED

Nagyapámnak



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS  
INFORMATIKAI KAR



MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI  
KUTATÓKÖZPONT  
GENETIKAI INTÉZET

A NITRÓGÉNKÖTŐ SZIMBIÓZIS GÉNJEINEK EVOLÚCIÓS és FUNKCIONÁLIS  
VIZSGÁLATA *Medicago truncatula* MODELLNÖVÉNYEN

Ph.D. értekezés

Bozsóki Zoltán

TÉMAVEZETŐ:  
Dr. Endre Gabriella  
tudományos főmunkatárs

MTA SZBK, Genetikai Intézet

2017  
SZEGED

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	4
Rövidítések jegyzéke.....	7
1. BEVEZETÉS .....	8
1.1. A növényi fejlődéshez szükséges makroelemek .....	8
1.2. Növény-mikroba szimbiózisok.....	10
1.2.1. Az arbuszkuláris mikorrhiza endoszimbiózis .....	12
1.2.2. A pillangósvirágúak nitrogénkötő endoszimbiózisa .....	13
1.2.2.1. A nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges növényi gének .....	14
1.2.2.2. A közös szimbiotikus útvonal génjei.....	16
1.3. Fehérjék ubikvitinációs mechanizmusa .....	17
1.3.1. Az E3 ubikvitin ligázok csoportosítása .....	19
1.3.1.1. A növényi E3 ubikvitin ligázok .....	19
1.3.1.2. E3 ubikvitin ligázok a nitrogénkötő szimbiózisban .....	20
1.3.1.2.1. A <i>M. truncatula</i> LIN .....	22
1.4. A nitrogénkötő szimbiózis evolúciós vizsgálata .....	23
1.4.1. Homológok, ortológia és paralógia .....	23
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	25
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
3.1. Bioinformatikai módszerek .....	26
3.1.1. Adatgyűjtés .....	26
3.1.2. A szekvenciák minőségellenőrzése és javítása.....	27
3.1.3. Szekvencia összehasonlítások, filogenetikai analízis és szinténia vizsgálat .....	28
3.2. Laboratóriumi anyagok és módszerek .....	28
3.2.1. Nukleinsav izoláció és szintézis.....	29
3.2.1.1. Növényi RNS tisztítás és cDNS szintézis.....	29
3.2.1.2. Növényi genomi DNS izolálás.....	29
3.2.2. Klónozások .....	29
3.2.2.1. A donor konstrukciók .....	30
3.2.2.2. A célvektorok.....	30
3.2.2.3. A növény transzformációs konstrukciók és a transzformációk ellenőrzése .....	32
3.2.3. A felhasznált baktérium törzsek.....	32



3.2.3.1. Baktérium transzformációk, a baktériumok tenyésztése .....	33
3.2.4. Növény transzformációs módszerek .....	33
3.2.4.1. <i>A. rhizogenes</i> közvetített gyökértranszformációk .....	34
3.2.4.1.1. A <i>M. truncatula</i> magok csíráztatása.....	34
3.2.4.1.2. A <i>M. truncatula</i> növények transzformációja és nevelése.....	34
3.2.4.2. <i>Nicotiana benthamiana</i> tranziens levéltranszformációk .....	35
3.2.5. A <i>M. truncatula</i> növények Rhizobium inokulációja.....	35
3.2.6. A <i>M. truncatula</i> <i>lin2</i> mutánsok.....	36
3.2.6.1. A <i>lin2</i> mutánsok gümöztési tesztje.....	36
3.2.7. Hisztokémiai festések.....	37
3.2.7.1. $\beta$ -glükuronidáz (GUS) festés .....	37
3.2.7.2. $\beta$ -galaktozidáz (X-Gal) festés .....	37
3.2.8. Fluoreszcens mikroszkópia.....	38
3.2.9. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) .....	38
4. EREDMÉNYEK.....	39
4.1. <i>Medicago truncatula</i> szimbiotikus gének ortológjai zárvatermő növényekben .....	39
4.1.1. A vizsgálatba bevont gének kiválasztása .....	39
4.1.2. A vizsgálatba bevont fajok kiválasztása.....	40
4.1.3. A kiválasztott homológ szekvenciák előzetes analízise .....	43
4.1.4. Az aminosav szekvencia illesztések összehasonlító elemzése .....	46
4.1.5. Az aminosav szekvenciák változása alapján felállított evolúciós kategóriák .....	49
4.2. A LIN géncsalád evolúciós vizsgálata.....	53
4.2.1. <i>LIN</i> homológ génszekvenciák gyűjtése és meghatározása.....	54
4.2.1.1. A <i>Vitis vinifera</i> <i>LIN</i> szekvenciájának meghatározása .....	55
4.2.1.2. Az <i>Adiantum capillus-veneris</i> páfrány <i>LIN</i> homológ szekvenciájának meghatározása .....	55
4.2.1.3. A <i>Medicago truncatula</i> <i>LIN2</i> szekvenciájának meghatározása.....	56
4.2.1.4. További <i>LIN2</i> homológ szekvenciák a növényvilágban.....	58
4.2.2. A LIN és LIN2 fehérjék evolúciós viszonyainak feltárása .....	60
4.3. A LIN géncsalád funkcionális vizsgálata.....	64
4.3.1. <i>M. truncatula</i> <i>lin</i> mutáns növények menekítési kísérletei.....	64
4.3.1.1. A <i>V. vinifera</i> <i>LIN</i> kópiával végzett menekítési kísérletek .....	65
4.3.1.2. Az <i>A. capillus-veneris</i> <i>LIN</i> kópiával végzett menekítési kísérletek.....	68
4.3.2. A <i>M. truncatula</i> <i>LIN2</i> funkcionális vizsgálata .....	69
4.3.2.1. A <i>MtLIN2</i> gén kifejeződése .....	71

4.3.2.2. A <i>LIN2</i> promóter aktivitásának jellemzése.....	72
4.3.2.3. <i>LIN2</i> sejten belüli lokalizációja .....	75
4.3.2.4. <i>M. truncatula LIN2</i> mutánsok.....	76
5. AZ EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA .....	79
5.1. <i>Medicago truncatula</i> szimbiotikus gének feltételezett ortológjai zárvatermő növényekben .....	79
5.1.1. A szimbiotikus gének fejlődésében felismert evolúciós trendek és funkcionális vonatkozásaik .....	81
5.1.1.1. Vajon tetten érhető, netán megjósolható a kapcsolat egy fehérje felismerhető változásai és a szimbiózisban betöltött funkciója között?.....	85
5.2. <i>LIN</i> homológok evolúciós és funkcionális elemzése .....	86
5.2.1. A <i>LIN</i> géncsalád feltárt evolúciós viszonyai .....	86
5.2.2. A <i>LIN</i> fehérjék funkciója .....	88
5.2.2.1. A <i>M. truncatula LIN2</i> gén kifejeződése és a fehérje lokalizációja .....	88
5.2.2.2. Más növényekből származó <i>LIN</i> homológok képesek szimbiotikus funkciót pótolni .....	91
5.2.3. Melyik génduplikációs evolúciós minta fedezhető fel a <i>LIN</i> és <i>LIN2</i> gének fejlődésében, és ez hogyan tükröződik a funkciójukban? .....	92
6. Köszönetnyilvánítás.....	95
7. IRODALOMJEGYZÉK .....	96
8. Összefoglaló .....	110
9. Summary .....	115
10. MELLÉKLETEK .....	121

## Rövidítések jegyzéke

Acv	<i>Adiantum capillus-veneris</i> (vénuzhaj páfrány faj)
as	aminosav
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (lúdfű, kutatási modellnövény)
BAC	bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial artificial chromosome)
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
CDS	kódoló szekvencia
Cp	<i>Carica papaya</i> (papaja)
Cs	<i>Cucumis. sativus</i> (uborka)
CSP	közös szimbiotikus (szignalizációs) útvonal (common symbiotic pathway)
EGFP	erősített zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)
EST	expressed sequence tag
gDNS	genomi DNS
IF	infekciós fonal
Kb	kilobázispár ( $10^3$ bp)
kDa	kilodalton (atomi tömeg egység)
LINh	LIN homológ
Lj	<i>Lotus japonicus</i> (a szarvaskerep közeli rokona, kutatási modellnövény)
Mb	megabázispár ( $10^6$ bp)
Ms	<i>Medicago sativa</i> (évelő lucerna faj, fontos takarmánynövény)
Mt	<i>Medicago truncatula</i> (mediterrán, egynyári <i>Medicago</i> faj, kutatási modellnövény)
Os	<i>Oryza. sativa</i> (rizs)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
Pt	<i>Populus trichocarpa</i> (nyárfa)
RNSi	RNS interferencia (géncsendesítés)
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i> (paradicsom)
Sm	<i>Selaginella moellendorffii</i> (csipkeharaszt faj)
UTR	nem transzlálódó régió (untranslated region)
Vv	<i>Vitis vinifera</i> (szőlő)
Zm	<i>Zea mays</i> (kukorica)

# 1. BEVEZETÉS

A nitrogénkötő szimbiózis vizsgálatának fontosságát napjainkban elsősorban annak kiemelkedő mezőgazdasági jelentőségével indokolják. Ez kétségtelen, azonban nem csupán a mezőgazdasági művelés alá vont területek, de az egész bolygó anyagáramlásában kulcsszerepet töltenek be a nitrogénkötő szervezetek és a velük szimbiózist kialakító növényfajok. A dolgozatomban bemutatott kutatás során a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges növényi gének fejlődését, evolúciós változásait vizsgáltuk. Tudni szeretnénk, milyen genetikai változásoknak köszönhetően képesek egyes növényfajok szimbiotikus nitrogénkötésre, míg mások nem. Milyen módosulásokon mentek keresztül egyes gének, géntermékek, míg a nitrogénkötő szimbiózis működőképes részévé váltak. Ez a munka két nagy, egymást kiegészítő egységre bontható. Publikus adatbázisok felhasználásával számos növényfajból gyűjtöttük össze szimbiotikus gének homológjait, melyeken informatikai eszközökkel összehasonlításokat végeztünk. Emellett egy E3 ubikvitin ligáz aktivitással bíró szimbiotikus fehérje, a *M. truncatula* LIN, és rokonai részletes evolúciós elemzésével, valamint funkcionális vizsgálatával kerestük a választ arra, hogy miként válhat egy géntermék a szimbiózis kialakításának nélkülözhetetlen szereplőjévé. A kutatási téma, és a megközelítések sokszínűsége miatt, a kapott eredmények szintéziséhez több, egymástól távolabb eső témakört is szükséges alább röviden bemutatnom.

## 1.1. A növényi fejlődéshez szükséges makroelemek

A talaj növények számára felvehető tápanyagtartalma számos termőhelyen korlátozó tényező a növényi fejlődés, produktivitás tekintetében. A korlátozás leggyakoribb oka az elérhető foszfor (P) illetve nitrogén (N) mennyisége.

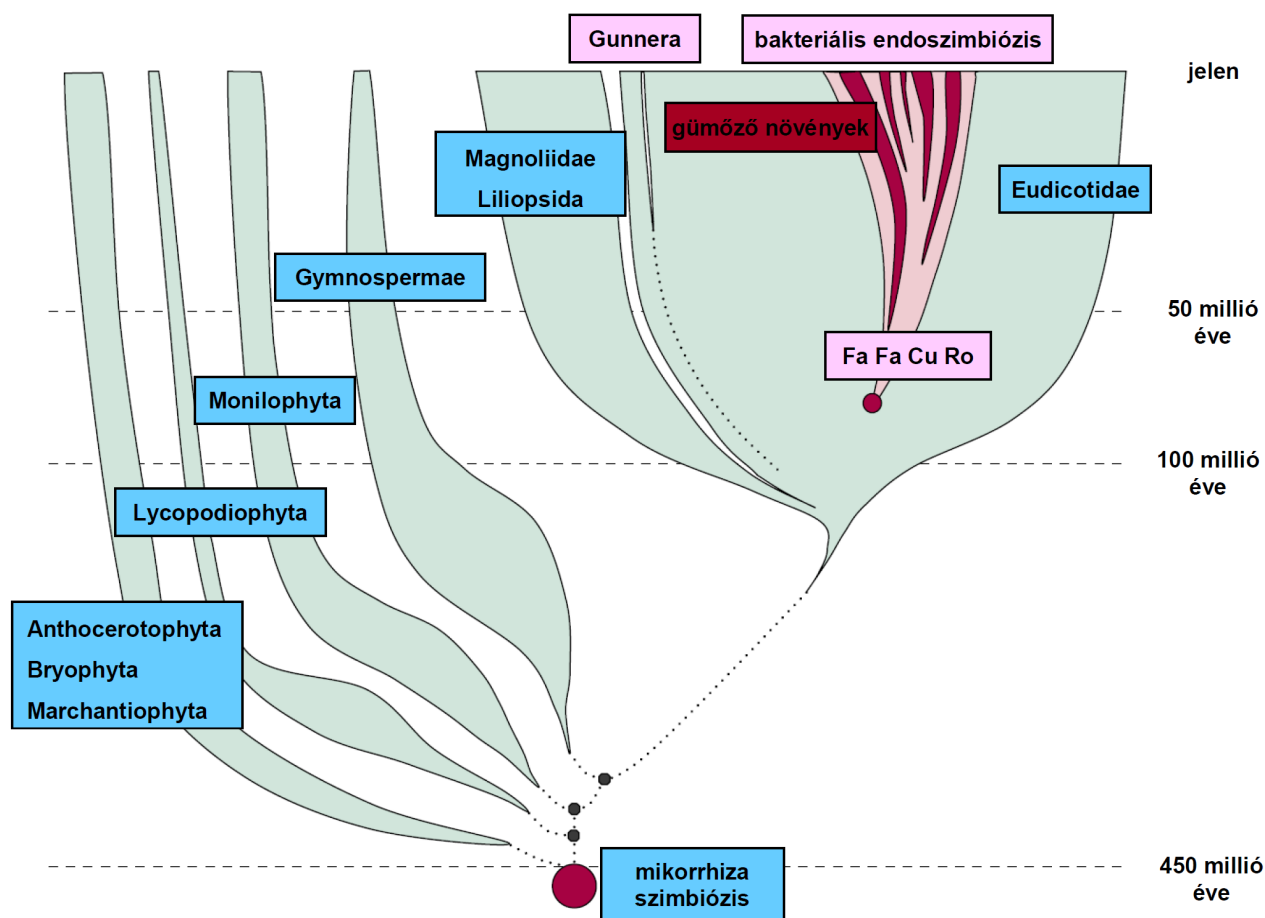
A P egy létfontosságú makroelem, a növényi szárazanyagnak mintegy 0,2%-át teszi ki. Igen reaktív, a természetben elemi formában nem fordul elő. Jellemzően szervetlen foszfát vegyületekben, vagy szerves anyagokban kötött formában található meg a talajban, illetve természetes vizekben. A talaj ún. oldott P készletét szinte kizárólag annak vízben oldott ortofoszfát ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) tartalma adja, a növények egyedül ebből a készletből veszik fel a P-t. Az oldott P készlet dinamikus egyensúlyban áll az ún. aktív P készlettel, ami a talaj szilárd fázisának könnyen oldható szervetlen P tartalmát, illetve a mikrobák által szerves anyagokból könnyen mobilizálható P hányadot jelenti. A talaj ún. kötött P készletét az oldhatatlan szervetlen foszfát

vegyületek, illetve a mikróbák által végzett mineralizációnak ellenálló szerves anyagokban kötött P teszi ki. A növények által nem hasznosítható forma aránya 20%-tól akár 80%-ig terjedhet. A mesterséges P utánpótlás, (mű-)trágyázás során kiszórt P akár több mint 80%-a gyorsan immobilizálódik a talajban, és adszorpció, precipitáció vagy szerves formává történő konverzió útján a növények számára elérhetetlenné válik (Holford, 1997; Dodd et al., 2013). Emellett a P jellemzően diffúzióval, igen lassan mozog a talajban, így az azt gyorsan felszívó gyökerek környezetében P hiány alakulhat ki. Egyes P hiányos élőhelyeken előforduló növények megnövelt felszínű speciális (ún. proteoid) gyökereket fejlesztenek, illetve nagy mennyiségben szerves savakat bocsájtanak a talajba, hogy így mobilizálják és alakítsák felvehetővé a P-t (O'Rourke et al., 2013). A talajban élő mikroorganizmusok aktívan befolyásolják az elérhető P mennyiségét, szerves anyagaikban megkötik, vagy éppen mineralizálják azt (Richardson and Simpson, 2011). E mikróbák közé tartoznak a mikorrhiza gombák is. E gombákkal kialakított szimbiózis révén számos szárazföldi növény képes hatékonyabbá tenni a P felvételét.

A földi légkör mintegy 78%-a elemi N gáz. Mégis, a P-t közvetlenül megelőzve, a N a növényi növekedést leggyakrabban limitáló makroelem. A szén, oxigén és hidrogén után a legnagyobb mennyiségben szükséges organogén elem. A N folyamatos körforgásban mozog az élőlények és a légkör között (Galloway et al., 2004). Az elhalt szerves anyagokból felszabaduló ammónia nitrifikáló mikroorganizmusok révén a növények által még hasznosítható nitritté, illetve nitráttá alakul, amit a denitrifikálók elemi dinitrogénné alakítanak tovább, így jut vissza a légkörbe. A természetben a villámlás során lezajló foto- és elektrokémiai reakciók során kis mennyiségben nitrogén-oxidok keletkeznek, melyek vízben oldva nitritté, nitráttá alakulnak. Emellett vulkáni működés, a fosszilis energiahordozók égetése, illetve ipari tevékenység szennyező melléktermékeként is keletkeznek, illetve jutnak a környezetbe nitrogén oxidok és ammónia. A modern mezőgazdaság egyre növekvő N utánpótlás igényét ipari úton előállított N műtrágyákkal elégíti ki. Előállításuk minden esetben a légköri nitrogén redukciójával történik, amihez a szükséges hidrogén gázt és energiát nem megújuló fosszilis energiahordozókból nyerik.

A légköri N<sub>2</sub> redukciójára csupán bizonyos prokarióták képesek, ezt nevezzük biológiai nitrogénkötésnek. Az indifferens N-t ammóniává redukálják, mely már a növények számára is felvehető. A nitrogénkötésre képes mikroorganizmusok lehetnek obligát szabadon élők, ezek szimbiota partner nélkül képesek a légköri dinitrogén redukcióját végző nitrogenáz enzim működéséhez elengedhetetlen mikroaerob környezet megteremtésére. Mások növényekkel laza (asszociatív), vagy szoros szimbiotikus kapcsolatban képesek a légköri nitrogén redukciójára. A biológiai nitrogénkötés ezen módjai eltérő arányban járulnak hozzá a különböző adottságú természetes élőhelyeken megkötött nitrogén mennyiségéhez. Bár a szimbiózisban végzett nitrogénkötés nagyságrendekkel hatékonyabb, globális szinten mind a szabadon élő nitrogénkötő

mikrobák működése, mind a szimbiotikus nitrogénkötés egyaránt nélkülözhetetlen a működő nitrogén háztartás fenntartásában (Reed et al., 2011).



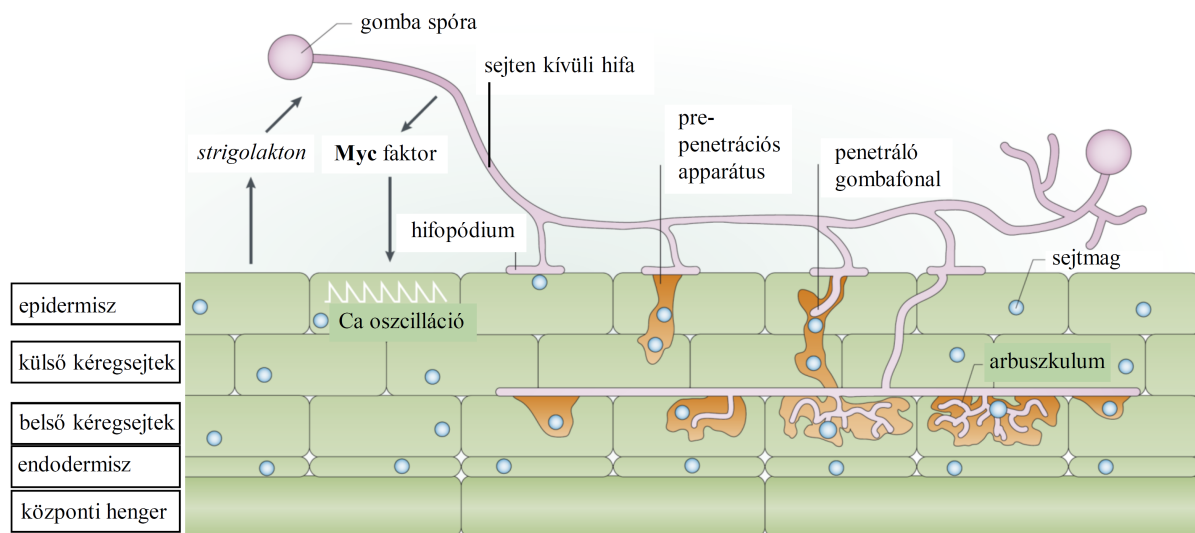
**1.1. ábra.** A mikorrhiza gomba (késsel) és nitrogénkötő bakteriális (pirossal) endoszimbiózisok elterjedése a szárazföldi növények törzsfajlódása során (az időskála az ábra jobb oldalán látható). A mikorrhiza szimbiózis jelen van a szárazföldi növények minden leszármazási vonalán, feltételezések szerint már az első szárazföldi növények szimbiózisban éltek mikorrhiza gombákkal (mintegy 460 millió évvel ezelőtt). A gyökér gümőket kialakító nitrogénkötő endoszimbiózis vélhetően többször megjelent a növények evolúciója folyamán, de minden esetben az egy monofilétikus egységet alkotó Fabales, Fagales, Cucurbitales és Rosales kládokon belül (Fa Fa Cu Ro). Különálló kivételt képeznek a *Gunnera* fajok. Ez utóbbi esetben a nitrogénkötő *Nostoc* cianobaktériumok a növények levélnyelének tövében elhelyezkedő sejteket fertőzik (Kistner and Parniske, 2002).

## 1.2. Növény-mikroba szimbiózisok

Az egyes élőhelyeken kialakuló korlátozott tápanyag elérhetőségre adott evolúciós léptékű válasz lehet a talajlakó mikroorganizmusokkal létrehozott szimbiotikus asszociáció, mely fontos makroelemeket juttat a növénynek (elsősorban P-t, illetve N-t) a fotoszintézis cukortermékeiért cserébe. Egy ősi együttélési forma a talajlakó gombákkal kialakított

arbuskuláris mikorrhiza szimbiózis. Ennek révén elsősorban foszfátvegyületekhez jut a növény. Kialakulását közel egyidőre datálják az első szárazföldi növények megjelenésével (Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000; Heckman et al., 2001), és azóta is jelen van a szárazföldi növények túlnyomó többségében (Brundrett, 2002). Emellett egy másik, jóval később kialakult, szimbiotikus együttélési forma is létrejött, nitrogénkötő talajbaktériumok és egymással közeli rokonságot mutató zárvatermő növényfajok egy szűk köre között, melyek a Fabales, Fagales, Cucurbitales és Rosales kétszikű (Dicotidae) csoportokba sorolhatóak (Soltis et al., 1999) (1.1 ábra). A talajbaktériumokkal kialakított nitrogénkötő szimbiózisnak két jelentős formája létezik. A pillangósvirágúak (Leguminosae vagy Fabaceae, Fabales), továbbá az egyetlen nem pillangós, a *Parasponia* (Rosales) nemzetség Gram-negatív talajlakó baktériumok változatos csoportjával, összefoglaló nevükön *Rhizobium*okkal alakít ki szimbiózist. Az aktinorrhiza szimbiózis pedig a Fagales, Cucurbitales és Rosales csoportok egyes fajai és a *Frankia* nemzetséghez tartozó Gram-pozitív, fonalas szerveződésű nitrogénkötő baktériumok között megfigyelt mutualisztikus együttélés (Pawlowski and Bisseling, 1996; Hocher et al., 2011). A nitrogénkötő endoszimbiózis kialakítása folyamán egy új növényi szerv képződik, a gyökérgümő. A szimbiionta baktériumok ebben végzik a légköri dinitrogén ammóniává történő redukcióját, amit a növény szerves molekulákba épít be. A természetes élőhelyeken betöltött szerepük mellett a nitrogénkötő szimbiózis kialakítására képes növények hatalmas gazdasági jelentőséggel is bírnak. Az ezekkel végzett vetésforgós termelés évszázadokon át biztosította a művelt földek termőerejének (a növények által felvehető nitrogén tartalmának) utánpótlását, ezáltal a magasabb terméshozamokat. A pillangósvirágúak termesztése napjainkban is kiemelt fontosságú, hiszen fenntartható és költséghatékony alternatív megoldást kínálnak a mezőgazdaság egyre növekvő nitrogén-utánpótlás igényére (Graham and Vance, 2003).

A mikorrhiza és nitrogénkötő endoszimbiózisok kialakulását és folyamatát korábban egymástól függetlenül írták le és nem találtak szembeötlő hasonlóságokat, azonban a molekuláris vizsgálatok számos hasonlóságot mutattak ki a két rendszer között, elsősorban genetikai szinten. A jelenleg rendelkezésre álló ismereteink alapján feltételezhetően szoros evolúciós kapcsolat fűzi össze a két jelentős növény-mikroba szimbiózist. Vélhetően az ősi mikorrhiza szimbiózis egyes elemeit felhasználva fejlődött a jóval fiatalabb nitrogénkötő szimbiózis (Parniske, 2008).



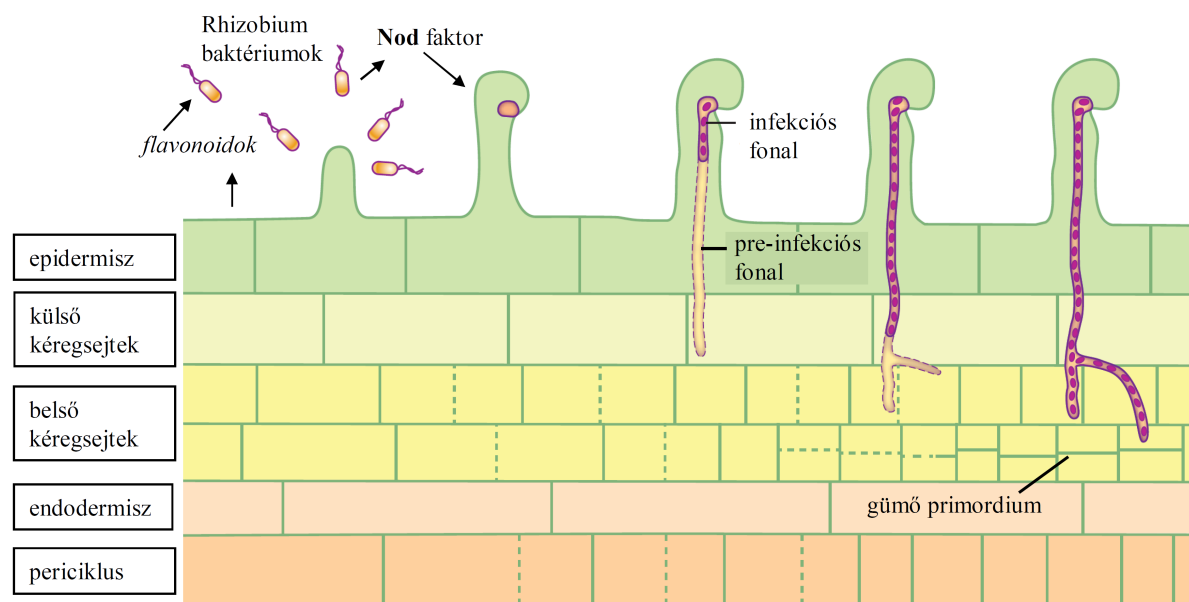
**1.2. ábra.** Az arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis kialakulása (Parniske, 2008).

### 1.2.1. Az arbuszkuláris mikorrhiza endoszimbiózis

Az arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis egy ősi, a növények széles körében elterjedt együttélési forma. Első előfordulása egybeesik az első szárazföldi növények mintegy 460 millió évvel ezelőtti megjelenésével. Feltételezhető, hogy az ezekkel a gombákkal kialakított szimbiózis tette lehetővé az első, kezdetleges szárazföldi növények számára a szárazföld kolonizálását (Redecker et al., 2000; Heckman et al., 2001). Ez azt is valószínűsíti, hogy a mikorrhiza szimbiózis kialakításának képessége már jelen volt a szárazföldi növények közös őseiben. Ebből következik, hogy azok a fajok, melyek ma nem léphetnek szimbiózisra mikorrhiza gombákkal, ezen képességüket elvesztették az evolúciójuk folyamán. Mikorrhiza szimbiózis kialakítására a recens szárazföldi növényfajok több mint 80%-a képes. A mikroszimbiota partner a Glomeromycota gombák közül kerül ki. Egy gombafaj számos növényfajjal képes szimbiózisra lépni, ugyanakkor egy növényfajt (akár egy egyedét is) egyszerre több gombafaj is kolonizálhat (Santos-Gonzalez et al., 2007). A növények által a rhizoszférába bocsájtott másodlagos anyagcseretermékek, strigolaktonok indukálják a Glomeromycota spóra csírázását, mely ezután a gyökér irányába növekszik, és elágazásokat hoz létre. Emellett a mikorrhiza gomba válaszul kitin vázas vegyületeket, ún. mikorrhizációs (Myc) faktorokat termel, melyek az azokat érzékelő gyökérsejtekben szimbiózis-specifikus válaszokat váltanak ki. Az epidermisz sejtekben a maghártya környezetében kialakuló periodikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció oszcilláció közvetítésével (Navazio and Mariani, 2008) a szimbiota gomba infekcióját elősegítő génexpressziós változások indulnak be. A gyökeret elérő hifán egy speciális appresszorium, a hifopódium alakul ki. A hifopódium alatt, annak folyamatos mechanikai és kémiai ingerlő



hatására a növényi sejt speciális struktúrát, ún. pre-penetrációs apparátust (PPA) hoz létre (Genre et al., 2005), mely a hifopódiumból leágazó gombafonalat elvezeti a gyökér belső kéregállományába. Itt a hifa kilép a sejtől, elágazik, és a gyökér tengelyével párhuzamosan növekszik az apoplastban. Ez a hifa PPA szerű struktúrák kialakítását indukálja a belső kéregsejteken, leágazásokat alakít ki, végül növényi membránnal határolt faagszerű struktúrákat, arbuszkulumokat hoz létre a sejtek belsejében. Az arbuszkulumok a növény és gomba közti anyagáramlás színterei (1.2. ábra). A gyökér belsejében a gombafonalak, még az arbuszkulumok is, mindvégig növényi membránnal és sejtfallal határoltak (Parniske, 2008). A szimbiionta gombának a gazdanövény gyökerén kívül növekedő hifái köbcentiméterenként több mint 100 m hosszan is behálózhatják a talajt, a gyökér kiterjesztéseként működve nagyságrendekkel növelik meg a felszívó felszínt (Miller et al., 1995), illetve a talaj olyan területeire is elnyúlnak, ahová a gyökerek már nem. A növény a fotoszintézis által termelt cukrok akár 20 %-át is a gombának juttathatja, mely cserébe ásványi anyagokkal, elsősorban P-ral, illetve vízzel látja el a gazdát (Bago et al., 2000).



**1.3. ábra.** A pillangós-Rhizobium nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának kezdeti folyamatai (Oldroyd et al., 2011).

### 1.2.2. A pillangósvirágúak nitrogénkötő endoszimbiózisa

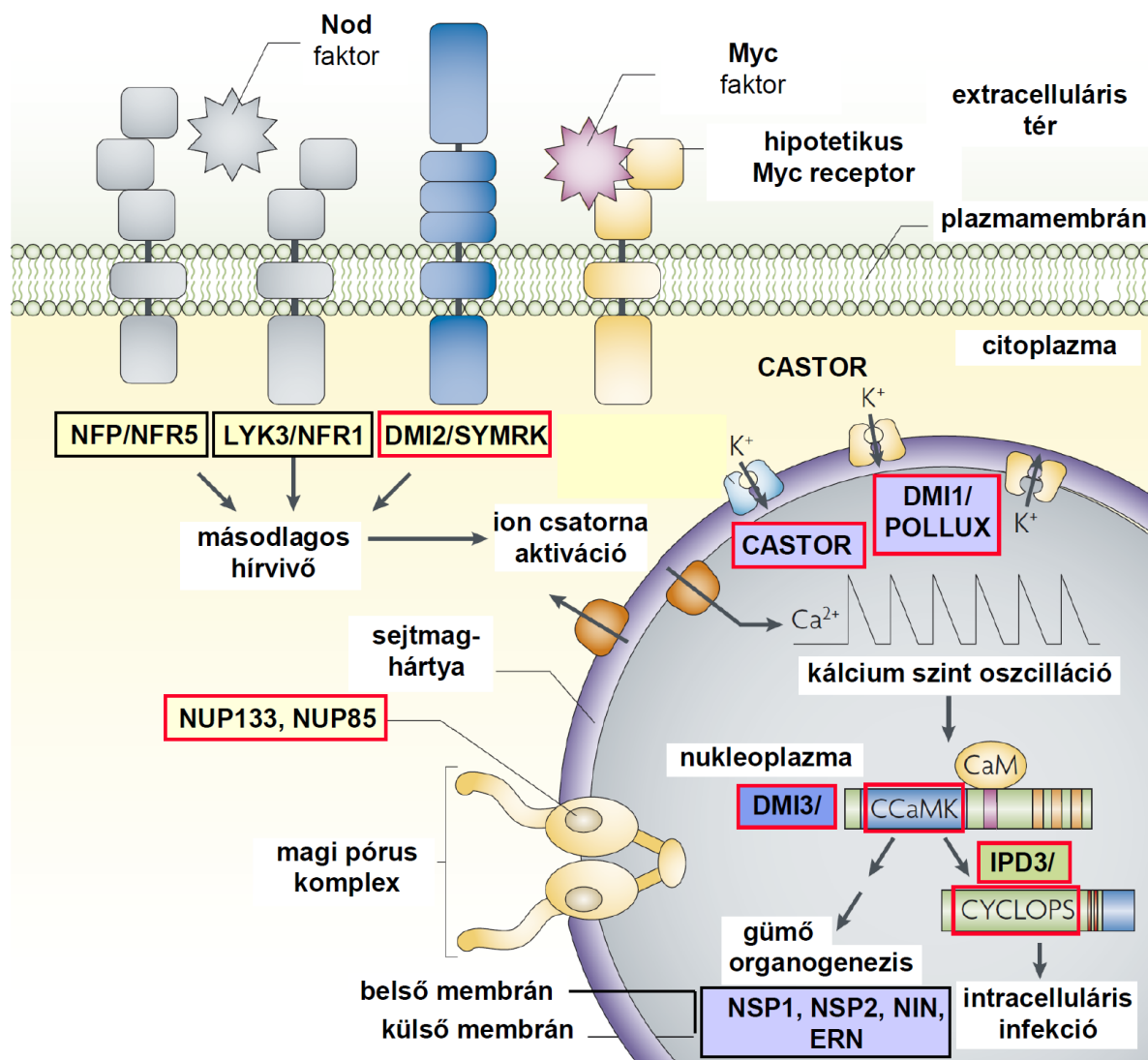
A gyökérgümőkben létrejövő nitrogénkötő szimbiózis képessége vélhetően többször is kialakult a szárazföldi növények törzsejlődése során (először mintegy 65 millió évvel ezelőtt, 1.1 ábra), ám minden esetben rokon növényfajok egy szűk csoportján belül (Swensen, 1996; Doyle et al., 1997). A pillangósvirágú növényfajok és Rhizobiumok között jellemzően egy szigorúan gazdaspecifikus együttélési mód alakul ki, általában egy baktériumfaj csak egy, vagy

néhány közeli rokon növény fajjal képes szimbiózisra lépni (Dénarié et al., 1992). A nitrogénkötő szimbiózis csakis olyankor jön létre, amikor nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű felvehető nitrogén a talajban, és kialakulásakor számos folyamat pontosan időzített és összehangolt sorozata játszódik le a két szimbionta szervezetben (1.3. ábra). A növény által a talajba bocsájtott flavonoid vegyületek a gyökérhez vonzzák a szimbionta baktériumfaj egyedeit, melyek a növény kémiai jelére fajspecifikus kémiai módosításokat hordozó kitin vázas oligoszacharidokat, ún. nodulációs (Nod) faktorokat kezdenek termelni. A Nod faktorokat a közeli gyökérszőrők érzékelik, és a növényben szimbiózis-specifikus fiziológiás és génexpressziós változások indulnak el (Hirsch, 1992; Denarie et al., 1996; Long, 1996; Spaink, 2000). Ezek az események kezdetben egymástól térben elhatárolva, időben párhuzamosan figyelhetők meg a gyökér szöveteiben. A szimbionta baktérium az epidermiszen, pontosabban a gyökérszőrőkön át hatol a gyökér belső sejtrétegeinek irányába. Ez az ún. infekció, melynek folyamán a baktérium mindvégig egy növényi membránnal és sejtfallal határolt csőszerű struktúrában, az infekciós fonálban halad több sejtrétegen keresztül (Gage, 2004). Az infekciós fonal útját a növény speciális citoplazma struktúrái, a pre-infekciós fonalak határozzák meg. Az infekciós folyamat kezdetével egy időben, számos sejtréteggel beljebb, a gyökér belső kéregállományában egyes sejtek visszanyerik osztódó képességüket, és kialakítják a gümőkezdemény sejtömegét. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához vezető események összehangolásához specifikus jelcseréken alapuló, folyamatos kommunikáció szükséges a növény és szimbionta, valamint a gyökér különböző szövetei között is (Gibson et al., 2008). A létrehozott gümőben a szimbionta baktériumok egy endocitózishoz hasonló folyamattal fűződnek le a gümősejtekbe, és így növényi membránnal körülfogva kerülnek a növényi sejt citoplazmájába. Ezeket nevezzük szimbioszómáknak, melyben a lefűződött baktériumok ún. bakteroidokká alakulnak. Ebben a formában végzik a légköri nitrogén redukcióját, melyhez a szimbioszómák mikroaerob környezete biztosítja a megfelelő körülményeket (Oldroyd and Downie, 2008).

#### **1.2.2.1. A nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges növényi gének**

A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása és működése során lejátszódó folyamatokat irányító növényi gének közül már számos gént, illetve génterméket leírtak. Elsősorban a két modell növény: a lucerna egy közeli, mediterrán elterjedésű rokona, a *Medicago truncatula* (Mt) (Cook, 1999) és a szarvaskerep egy közeli rokona, a *Lotus japonicus* (Lj) (Sato and Tabata, 2006) vizsgálatával sikerült ezeket azonosítani. Főként a szimbiotikus kapcsolat kialakulásának

kezdeti lépéseiben szerepet játszó géneket ismerjük már (1.4. ábra). Tudjuk, hogy a bakteriális jelmolekulák érzékeléséhez és a jelátviteli útvonal aktivizálásához LysM típusú receptor kinázok (MtLYK3, MtNFP, LjNFR1, LjNFR5) (Amor et al., 2003; Limpens et al., 2003; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006; Mulder et al., 2006) és egy LRR ismétlődéseket is tartalmazó receptor kináz (*Medicago sativa* NORK/MtDMI2/LjSYMRK) (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002; Bersoult et al., 2005) működése szükséges, mely a gyökérszőr sejtmagjának környezetében kalciumszint ingadozás kiváltásához vezet (Wais et al., 2000). Ez a jellegzetes periodikus kalciumszint oszcilláció nukleáris pórus komplex elemek (LjNUP133, LjNUP85) (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007) és egy feltételezett kation csatorna (MtDMI1/LjCASTOR és LjPOLLUX) (Ane et al., 2004; Charpentier et al., 2008) közreműködésével jön létre, s szignálként szolgál a további folyamatokhoz. Ennek dekódolását egy sejtmagi kalcium-kalmodulin függő protein kináz (MtDMI3/LjCCaMK) (Mitra et al., 2004; Tirichine et al., 2006) végzi egy kölcsönható partnerrel együtt (MtIPD3/LjCYCLOPS) (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008), és különböző transzkripciós faktorok (MtNSP1/LjNSP1, MtNSP2/LjNSP2, MtERN, MtNIN/LjNIN) (Schauser et al., 1999; Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Marsh et al., 2007; Middleton et al., 2007; Murakami et al., 2007) felé továbbítja a jelet. Az *LjNAPI*/*MtRIT* és *LjPIR1* gének az infekciós fonal kialakítása és haladása folyamán bekövetkező aktin-sejtváz átrendezésben vesznek részt (Yokota et al., 2009; Miyahara et al., 2010). Az *MtLIN*/*LjCERBERUS* gének E3 ubikvitin ligázt kódolnak, mely nélkülözhetetlen az infekciós fonal továbbhaladásához a gyökérszőrökből a lejjebb elhelyezkedő sejtrétegek felé, emellett szükséges a gümő primordium további fejlődéséhez is (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). E szimbiotikus jelátviteli hálózat kapcsolatot létesít a növény citokinin szignalizációs útvonalával is, egy a szimbiotikus nitrogénkötéshez nélkülözhetetlen citokinin receptor (MtCRE1/LjLHK1) (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Tirichine et al., 2007) révén. A növény a szimbiózis kialakításának és fenntartásának teljes ideje alatt szigorúan, de dinamikusan képes szabályozni a gümőképződés folyamatát, s ebben további LRR-receptor kinázok vesznek részt (LjHAR1/MtSUNN és LjKLV) (Nishimura et al., 2002a; Schnabel et al., 2005; Miyazawa et al., 2010).



**1.4. ábra.** A szimbiózis kialakításának részben feltárt korai szignalizációs útja (Parniske, 2008). A szimbiotikus fehérjék elnevezése a *M. truncatula* illetve a *L. japonicus* nevezéktant követi. Ahol a két fajban más néven ismertek az ortológ géntermékek, ott mindkét nevet feltüntettük. A közös szignalizációs út elemeit piros keretezés emeli ki.

#### 1.2.2.2. A közös szimbiotikus útvonal génjei

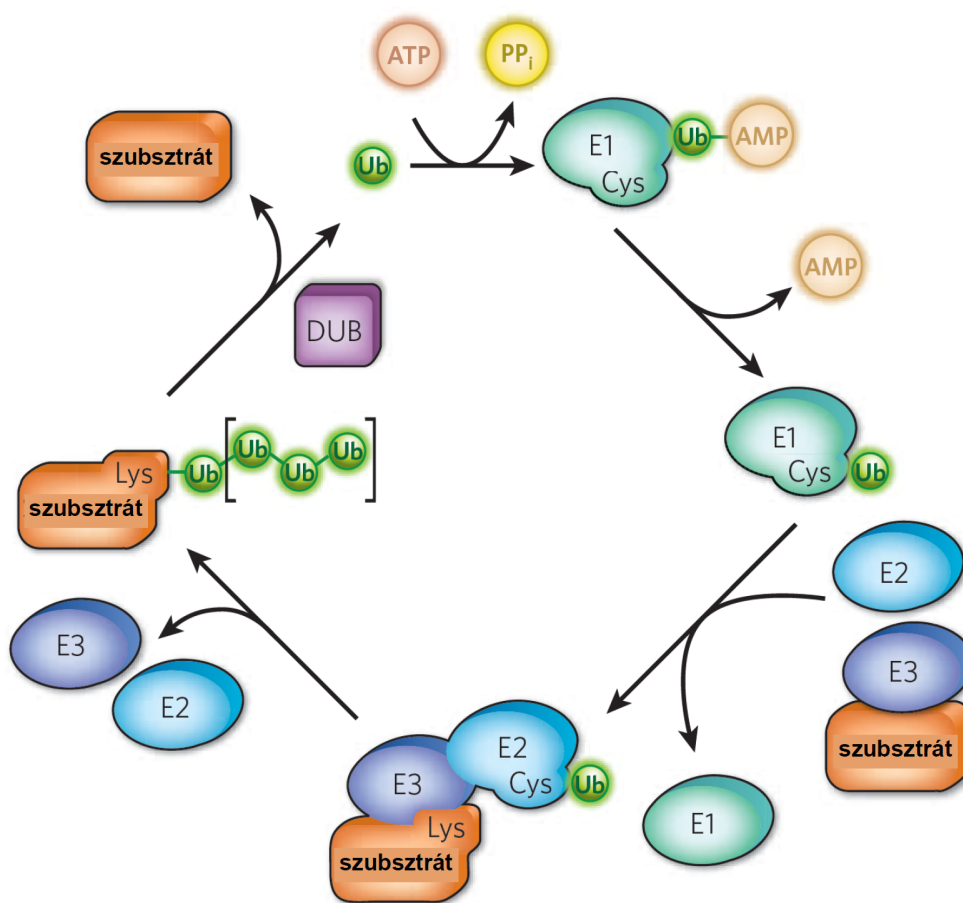
Az arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis genetikai analízise - a rendszer vizsgálatának nehézségei következtében (körülményesen tenyésztethető obligát biotróf szimbionta, cönocitikus gomba micélium, stb.) - a nitrogénkötő szimbiózishoz képest lemaradva, viszonylag későn kezdődött el. A mikorrhiza szimbiózis kialakításához szükséges növényi génekkel kapcsolatos ismereteink javarészt a Rhizobium-pillangósvirágú szimbiózis genetikai vizsgálatának köszönhetőek. A nitrogénkötő szimbiózis kialakításának képességét elveszített mutáns növények mikorrhizációs hajlandóságát vizsgálva fény derült arra, hogy néhány mutáns mikorrhiza együttélésre sem képes, tehát a bennük mutációt szenvedett gének mindkét szimbiózis

kialakításához nélkülözhetetlenek (1.4. ábra). Ezeket nevezzük a közös szimbiotikus útvonal (CSP) génjeinek, melynek azonosított tagjai a következő gének: *MsNORK/MtDMI2/LjSYMRK*, *MtDMI1/LjCASTOR* és *LjPOLLUX*, *LjNUP133*, *LjNUP85*, *MtDMI3/LjCCaMK* és *MtIPD3/LjCYCLOPS* (Kistner et al., 2005; Horváth et al., 2011). A jelenleg elfogadott tudományos nézet szerint feltételezhető, hogy az ősből mikorrhiza rendszer már meglévő molekuláris apparátusának bizonyos elemeit felhasználva fejlődött ki a nitrogénkötő endoszimbiózis (Kistner and Parniske, 2002; Kosuta et al., 2008; Parniske, 2008). Ahogy az 1.4. ábra is szemlélteti, a kétféle mikroszimbiota jelmolekuláit külön, specifikus receptorok ismerik fel, majd a másodlagos jelátvivő utak elemei azonosak a két rendszerben. Ezután a szignál transzdukció ismét szétválni látszik, az útvonalak további tagjai (pl. transzkripció faktorok) a szimbiózis függvényében specializáltak.

### 1.3. Fehérjék ubikvitinációs mechanizmusa

A fehérjék gyakran esnek át kémiai módosításokon a sejtekben, ami megváltoztatja fizikai, ezen keresztül pedig fiziológiai tulajdonságaikat is. A kémiai módosítás jelentheti akár egy másik protein, vagy akár proteinek polimer láncának a hozzacsatolását is az eredeti fehérjéhez. A legismertebb ilyen módosító fehérje az ubikvitin. Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló polipeptid, az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje (Sharp and Li, 1987), amely azonban teljesen hiányzik a prokarióta (Eubacteria és Archaea) genomokból. Az ubikvitináció folyamán rendszerint annak C-terminális glicinje kapcsolódik a szubsztrát fehérje egy lizinének  $\epsilon$ -aminocsoportjához. Ez egy háromlépcsős enzim kaszkád révén valósul meg (Pickart, 2001). Az ubikvitin molekula glicinje csak aktiváció után képes kovalens kötést kialakítani egy másik proteinnel. Az aktivációt az ubikvitin aktiváló (E1) enzim végzi egy ATP-függő folyamatban. A reakció eredményeként egy E1-ubikvitin tioészter alakul ki az enzim egyik cisztein oldalláncán. A molekula az E1-ről ezután az ubikvitin konjugáló (E2) enzim aktív helyének ciszteinjére adódik át. Az E2 enzim katalizálja a szubsztrát (cél)fehérje ubikvitinációját. Ebben a folyamatban szükség van az ubikvitin ligáz (E3) enzim közvetítő szerepére, mely képes kötni mind a szubsztrát, mind az E2 proteint, továbbá segíti az ubikvitin és szubsztrát fehérje közötti izopeptid kötés kialakulását. Ubikvitináció történhet csupán egyetlen fehérje oldalláncon (mono-ubikvitináció), vagy több oldallánc is kaphat egyetlen ubikvitin módosítást (multi-mono-ubikvitináció). Ezen kívül ubikvitin láncok is épülhetnek a már szubsztráthoz kapcsolt ubikvitin molekulák egyik lizinjéhez kapcsolódóan kialakítva az oldalláncot. Az ubikvitin molekulák kapcsolódhatnak rendszeresen az azonos pozícióban lévő lizineken keresztül (homotipikus poli-

ubikvitináció), de az ubikvitin molekulák más-más pozícióban elhelyezkedő lizinjei is részt vehetnek a lánc meghosszabbításában egy láncon belül (heterotipikus poli-ubikvitináció). A poli-ubikvitin láncok lehetnek lineárisak, vagy elágazóak is (Komander, 2009). A mono- és poli-ubikvitinációt gyakran más-más E2 enzimek végzik (Rodrigo-Brenni and Morgan, 2007; Windheim et al., 2008). Az ubikvitin módosításokat ubikvitin-kötő fehérjék ismerik fel. Ebben ubikvitin-kötő doménjeik (UBD) játszanak szerepet, melyek több mint 20 különböző domén családba sorolhatóak (Dikic et al., 2009). A fehérjék ubikvitinációjának nemcsak a módja, hanem a hatása is változatos lehet. A legismertebb következmény a poli-ubikvitinált fehérjék ATP függő lebontása a 26S proteasómában (Ciechanover and Schwartz, 1998). Ugyanakkor bizonyos poli-ubikvitin módosítások dokkoló helyeket jelenthetnek protein komplexek kialakításához, szerepet játszhatnak immun szignalizációs folyamatokban, illetve a DNS hibajavításában (Chen and Sun, 2009). A szubsztrát monoubikvitinációja megváltoztathatja annak aktivitását (pl. allosztérikus reguláció útján), vagy lokalizációját, elindíthatja a fehérje internalizációját/endocitózist, illetve lizoszómába irányíthatja azt. Az ubikvitináció nem irreverzibilis módosítás. Léteznek olyan specifikus de-ubikvitináló enzimek, melyek képesek eltávolítani az ubikvitin oldalláncokat (Komander et al., 2009).



1.5 ábra

---

**1.5. ábra.** Az ubikvitin konjugációs ciklus sematikus ábrája ((Hochstrasser, 2009). Az ubikvitin molekulát (Ub) az ubikvitin aktiváló enzim (E1) aktiválja egy ATP függő folyamatban. Az aktivált ubikvitin ezután az E1-ről az ubikvitin konjugáló enzimre (E2) kerül, ami az ubikvitin ligáz (E3) enzim segítségével ubikvitinálja a szubsztrát fehérjét. A folyamat szubsztrátspecifitását az E3 ligáz határozza meg, az kötődik az ubikvitinálendő fehérjéhez, illetve az aktivált ubikvitint hordozó E2-höz. Deubikvitináló enzimek (DUB) eltávolíthatják a fehérje ubikvitin dekorációit.

---

### **1.3.1. Az E3 ubikvitin ligázok csoportosítása**

Az ubikvitináció szubsztrát specifikálásának meghatározásért az E3 ubikvitin ligázok felelősek. Míg az emberi genom csupán két E1 enzimet és mintegy 40 E2 enzimet kódol, az E3 ligázok esetén ez a szám több mint 600-ra tehető (Groettrup et al., 2008; Li et al., 2008; Michelle et al., 2009). Működési mechanizmusuk és az ubikvitin ligáz funkcióért felelős doménjük alapján az E3 ligázok négy csoportba sorolhatóak. Ezek: az SCF (Skp-Cullin-F-box) komplex, az APC (Anaphase Promoting Complex), a HECT (Homology to E6-associated protein Carboxyl Terminus) domént hordozó, és a RING (Really Interesting New Gene) vagy U-box domént tartalmazó E3 ligázok (az U-box a RING domén egy változata, Aravind and Koonin, 2000). Az első két csoportba multimer E3 enzimek tartoznak, ahol a szubsztrát specifikálás meghatározásáért az SCF komplexben az F-box alegység, míg az APC-ben két adaptor, a CDC20, illetve a Cdh1 a felelős. Mindkét multimer csoportban RING domén (vagy annak módosult változata) felelős az ubikvitin ligáz aktivitásért (Deshaies and Joazeiro, 2009). Az SCF komplex és az APC is központi szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában, elsősorban sejtciklus szabályozó kulcsfehérjék poli-ubikvitinációjával, és proteaszómális lebontásra ítélésével (Teixeira and Reed, 2013). Az utolsó két csoportba tartozó E3 enzimek monomerként működnek. Ezeket az E2 ubikvitin konjugáló enzimmel kölcsönható doménjük alapján nevezték el (HECT vagy RING/U-box), ugyanakkor a szubsztrát specifikálás meghatározásáért egyéb doménjeik felelősek, így sokféle domén összetétel jellemezheti őket, funkciójuk is szerteágazó lehet. Részt vehetnek pl. az immunválaszt, a sejtosztódást, és növekedést szabályozó jelátviteli folyamatokban, de az apoptózis vagy az angiogenezis regulációjában is (Rotin and Kumar, 2009; Lipkowitz and Weissman, 2011; Metzger et al., 2012).

#### **1.3.1.1. A növényi E3 ubikvitin ligázok**

A növények között a modellnövény *Arabidopsis thaliana* genomjában azonosították először az összes lehetséges gént, melyek az ubikvitinációért felelős enzimeket kódolják. Az

emberhez hasonlóan összesen kettő E1 és 37 E2 enzimet kódoló gént találtak (Kraft et al., 2005), míg az E3 ligázokat kódoló géneknek az *Arabidopsis* genomszekvencia alapján prediktált száma lényegesen magasabb, mintegy 1300 (Smalle and Vierstra, 2004). Különösen az F-box (Gagne et al., 2002) és U-box tartalmú E3 fehérjék száma nagyobb jelentősen. Az E3 ligázok felelősek a pontos szubsztrát azonosításért az ubikvitináció folyamán. A növényi E3 enzimek magas száma azoknak a növényi működések regulációjában betöltött kimagasló jelentőségét jelzi. E3 ubikvitin ligázok központi szerepet töltenek be a növényi hormon jelátviteli folyamatokban, a fotomorfogenezisben, a sejtciklus szabályozásában, abiotikus és biotikus stresszválaszokban (Yee and Goring, 2009). A növény-mikroba kölcsönhatások folyamán E3 ligázok szerepét először a patogének keltette válaszreakciók során írták le (Zeng et al., 2006), de mára egyre több ubikvitin ligáz szerepe körvonalazódik a nitrogénkötő szimbiózis folyamán is.

#### **1.3.1.2. E3 ubikvitin ligázok a nitrogénkötő szimbiózisban**

Bizonyos E3 ubikvitin ligázokról bebizonyosodott, hogy fontos szerepük van a nitrogénkötő szimbiózis különböző szakaszaiban (Hervé et al., 2011). Vannak, amelyek a gümőképződés, mások a szimbiotikus infekció folyamán működnek, emellett egyesek általános fejlődési folyamatokban is részt vesznek- ezek pontos szimbiotikus funkciója jellemzően nehezen meghatározható, az általános hatásuktól nehezen elválasztható. Elsőként a *CCS52A* nevű gént azonosították lucernában (*M. sativa*), mely egy APC aktivátort kódol, és a differenciálódó gümősejtekben zajló endoreduplikáció folyamatához szükséges (Vinardell et al., 2003). Emellett több monomer E3 ligázzal kapcsolatban vannak adatok arra vonatkozóan, hogy közrejátszanak a szimbiózis folyamatának szabályozásában (is). A *L. japonicus* *ASTRAY* egy RING és egy DNS kötő bázikus leucin cipzár (bZIP) domént hordoz (Nishimura et al., 2002b). A gén az *A. thaliana* *HY5* transzkripciós faktor homológja (Oyama et al., 1997), az *astray* és *hy5* mutánsok hibás fényérzékelése, és gravitropizmusra igen hasonló, de a *hy5* mutánsoknál megfigyelt megnövekedett oldalgyökér kezdemény szám az *astray* növényekre nem jellemző, ehelyett szupernodulációs fenotípust, megemelkedett gümőszámot mutatnak (Nishimura et al., 2002c). Továbbá az *ASTRAY* fehérje szerkezete csak pillangósvirágúakra jellemző, a RING domén hiányzik a *HY5* fehérjéről. A *M. sativa* *RH2-1* gén egy N-terminális transzmembrán és egy RING-H2 domént (a RING domén egy ciszteinje ebben hisztidinnel helyettesített) hordozó fehérjét kódol (Karlowski and Hirsch, 2003). Általánosan kifejeződik a növény szerveiben, de mRNS-e legmagasabb mennyiségben a gyökérben és a gümőkben mutatható ki. Az *RH2-1* fehérje túltermeltetése drámaian lecsökkentette a kísérleti növényeken keletkezett gümők



számát, emellett azonban egyéb általános fejlődési rendellenességek is kimutathatóak voltak. Ezek az auxin hormon szignalizációban bekövetkező zavarokra utalhatnak, így a MsRH2-1 közvetlen szerepe a nitrogénkötő szimbiózisban egyelőre nem tekinthető bizonyítottnak. A *L. japonicus nsRING* gén szimbiionta inokulációra indukálódik, specifikus kifejeződést mutat a gümőfejlődés korai szakaszában, emellett riporter gén kísérletek alapján expressziója gümőkben a fertőzött sejtekre korlátozódik (Shimomura et al., 2006). A fehérje egy RING-H2 domén mellett, öt ismeretlen funkciójú HHE domént és egy CHY cink-ujj domént hordoz, ami fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában vehet részt. Az *LjnsRING* RNS interferencia (RNSi) csendesített gyökerek fejlődési rendellenességeket, továbbá erősen lecsökkent gümőszámot mutattak, ami az infekciós fonal iniciáció erős gátlásával hozható összefüggésbe. A *M. truncatula* genom összesen 6 SINA fehérjét kódol, mindegyikük hordoz egy RING és egy SINA domént, az utóbbi fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában vehet részt (Den Herder et al., 2008). *M. truncatula*-ban mind a 6 SINA gén kifejeződik a gyökerekben és gümőkben is, de egyedül a *MtSINA4* expressziója emelkedik a gümőfejlődés folyamán. *A. thaliana* homológjuk, a *SINAT5* az auxin indukált oldalgyökér fejlődésben játszik szerepet (Xie et al., 2002). A SINA fehérjék gyakran dimerként, vagy oligomerként működnek (Hu and Fearon, 1999), élesztő két hibrid kísérletben, a homodimerizáción túl, valamennyi MtSINA fehérje képes volt dimer kialakítására bármelyik másik MtSINA géntermékkel, és az *A. thaliana* SINAT5 vad típusú és domináns negatív hatású RING domén mutáns (SINAT5DN) formájával is. Transzgenikus *M. truncatula* növényeken az *A. thaliana* SINAT5DN szekvencia növekedést okozott a levélméretben, és az oldalgyökerek számában, illetve késleltette, de nem gátolta a szimbiotikus gümőfejlődést. A transzgenikus gyökereken nagy számú infekció indult, ezek azonban rosszul fejlődtek, és a bakteroidok lefűződése, a szimbioszóma kialakulása is hibát szenvedett. A LRR típusú receptor kináz LjSYMRK élesztő két hibrid rendszerben kölcsönható partnere több *L. japonicus* SINA fehérjének (Den Herder et al., 2012). Ezek közül a LjSINA4 tranziensen transzformált dohánylevél sejtek plazmamembránjának citoszolikus oldalán kolokalizációt mutat az LjSYMRK fehérjével, emellett negatívan befolyásolja annak mennyiségét. *L. japonicus* gyökerekben az ektopikusan túltermeltetett SINA4 negatívan hatott SYMRK mennyiségére, illetve zavart okozott a szimbiotikus infekció során, abnormálisan fertőzött gümőket eredményezett. Az LjSINA4 aspecifikus *in vitro* ubikvitinációs tesztben aktívnak bizonyult, tehát valóban egy aktív ubikvitin ligáz. Egy másik E3 ligáz is kölcsönhat a SYMRK-val, ez a *L. japonicus* SIE3 (Yuan et al., 2012). A gén expressziója szimbiionta fertőzés hatására indukálódik a gyökerekben, majd az érett gümőkben lecsökken az *LjSIE3* mRNS szintje. A fehérje egy CTLH, egy CRA és egy RING domént hordoz, élesztő két hibrid rendszerben autoaktív, dimerizációra képes. SIE3 képes önmagát *in vitro* és a SYMRK fehérjét *in planta* (dohány

levélben) ubikvitinálni. *L. japonicus* növényekben túltermeltetve elősegítette a transzgenikus gyökerek gümözését, míg az *LjSIE3* gén csendesítése gátolta az infekciós fonalak fejlődését és a gümő organogenezist. A *M. truncatula* PUB1 fehérje a LysM receptor kináz LYK3 kölcsönható partnere (Mbengue et al., 2010). Egy, az N-terminális részén elhelyezkedő, egyes *A. thaliana* PUB fehérjékben kimutatott, ismeretlen szerepű domén mellett, egy U-box domént, és legalább 5 Armadillo ismétlődést hordoz. *In vitro* a LYK3 fehérje képes a PUB1 fehérje foszforilációjára, PUB1 pedig képes önmagát ubikvitinálni, de LYK3-at nem. Túltermeltetve a MtPUB1 fehérje késlelteti a gümözést. A gyenge *lyk3* (*hcl-4*) allélt homozigóta módon hordozó mutánsok képesek gümőket kialakítani, azonban a szimbiotikus infekció abnormalis, vagy gátolt (Smit et al., 2007). A *PUB1* csendesítése *M. truncatula* *hcl-4* mutánsokon megemelkedett gümőszámot, és normális infekciós fonal fejlődést figyeltek meg. Ezek alapján a PUB1 fehérje a gümözés negatív regulátora, ami hatását elsősorban az infekciós fonal iniciációjában és fejlődésében fejejt ki, a LYK3-mal együttműködve. Egy további, a szimbiotikus infekcióban szerepet játszó U-box E3 ubikvitin ligáz gén, a *M. truncatula* modell növényben azonosított *LIN*, illetve *L. japonicus* ortológja, *CERBERUS*.

#### 1.3.1.2.1. A *M. truncatula* *LIN*

Genomi környezetük, szekvenciájuk, és a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepük alapján *MtLIN* (Kiss et al., 2009) és *LjCERBERUS* (Yano et al., 2009) ortológoknak bizonyultak. A fehérjék egy E2 kölcsönható U-box domént, egy Armadillo domént és WD40 ismétlődéseket tartalmaznak, melyek fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vehetnek részt. Ezen túl N-terminálisukon egy kiterjedt, jól konzervált, csak rájuk és ortológjaikra jellemző, csupán növényi szekvenciákban előforduló, ún. LIN domént hordoznak. Promóter-riportergén kísérletek alapján mindkét gén kifejeződik a gümő primordiumokban. Emellett *CERBERUS* a *L. japonicus* kifejlett gümők szimbiontákkal fertőzött sejtjeiben, *LIN* pedig a *M. truncatula* gümők merisztematikus és infekciós zónájában fejeződik ki, de a nitrogénkötő zónában nem, vagy sokkal gyengébben. A nitrogénkötő szimbiózis kialakítása a *lin* (Kuppusamy et al., 2004) és *cerberus* mutáns gyökereken is korán leáll. A gümő fejlődni kezd, de nem jut túl a primordium fázison, feltehetően a szimbiotikus infekció korai leállása miatt a gümő sem fejlődik tovább. A MtDMI3/LjCCaMK kalcium-kalmodulin függő protein kináz funkcionyeréses (autoaktív) formája spontán gümözést indukál szimbionta baktérium hiányában is (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2006). Az autoaktív kalcium-kalmodulin függő protein kináz kópiával transzformált *lin* és *cerberus* mutáns növények is képesek voltak spontán gümők létrehozására,

ami arra utal, hogy LIN/CERBERUS a szimbiotikus infekcióhoz nélkülözhetetlen, míg a gümőképződéshez önmagában nem az. *L. japonicus cerberus* mutáns növények gyökerén Takeda és csoportja (2013) csökkent mikorrhiza kolonizációt mutatott ki, ami CERBERUS mikorrhizációban betöltött esetleges szerepére utalhat.

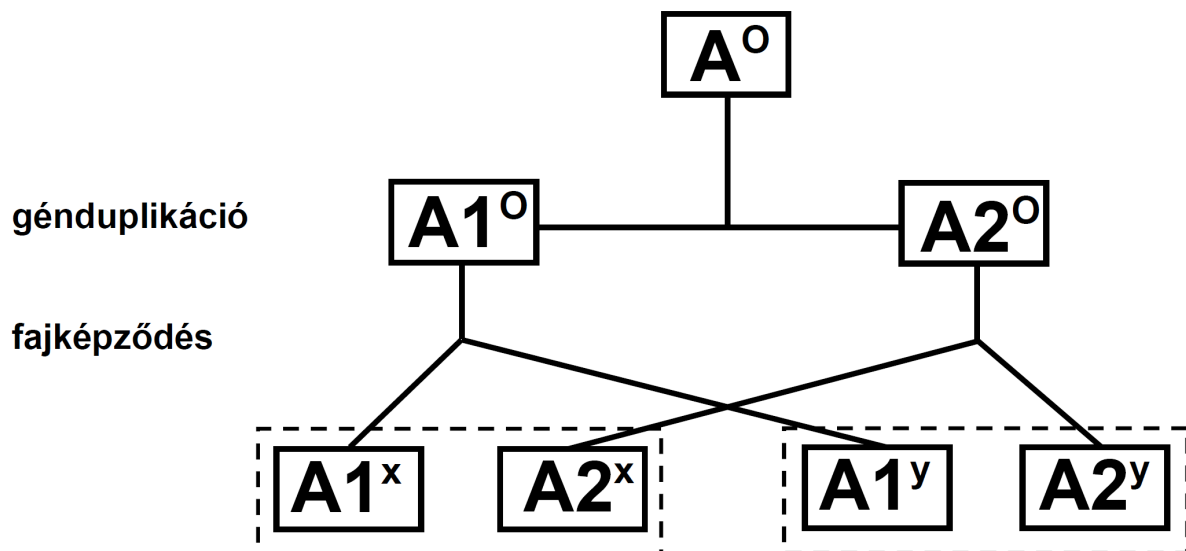
#### **1.4. A nitrogénkötő szimbiózis evolúciós vizsgálata**

Evolúciós vizsgálatok már korábban is készültek a szimbiotikus nitrogénkötésre képes fajokon, illetve a szimbiózis kialakításához szükséges egyes géneken. A nitrogénkötő gyökérgümők kialakítására képes fajok parafiletikus csoportot alkotnak. A gümöző fajok mind egy közös ős faj leszármazottai, azonban e közös ős nem minden leszármazottja képes szimbiotikus nitrogénkötésre (Soltis et al., 1995). A gümöző képesség vélhetően többször kialakult e növénycsoport evolúciója folyamán (Doyle, 1998; Doyle, 2011). Ez olyan változás, illetve változások sorának felhalmozódását feltételezi a szóban forgó ős fajban, aminek eredményeképp a leszármazott fajok bizonyos leszármazási vonalaiban könnyen megjelenhetett a nitrogénkötő szimbiózis kialakításának képessége. Ez az úgynevezett predispozíció azt is feltételezi, hogy a nitrogénkötő szimbiózis folyamán működő gének, géntermékek részben jelen lehetnek nem gümöző fajokban is, így a szimbiotikus nitrogénkötésre nem specifikus működéssel (is) rendelkeznek (Gianinazzi-Pearson, 1996; Hirsch et al., 1997). A nitrogénkötő szimbiózis során működő egyes gének filogenetikai kapcsolatait vizsgáló munkák (Schauser et al., 2005; Zhang et al., 2009; Lohmann et al., 2010; Delaux et al., 2013) megállapították, hogy ezek a gének rendelkeznek ortológokkal nitrogénkötő szimbiózis kialakítására nem képes növényfajokban is. Eddig a szimbionta mikroba partner felismerésében részt vevő egyes gének (*NORK/DMI2*, LysM típusú receptor kinázok) esetében bizonyították, hogy a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajokban létező kópiáik szekvenciáját pozitív szelekció formálta (De Mita et al., 2006; Lohmann et al., 2010).

##### **1.4.1. Homológok, ortológia és paralógia**

A dolgozatban szimbiotikus gének és géntermékek különböző fajokból kiválasztott homológjait: ortológokat és paralógokat vizsgáltunk. Homológia, ortológia, paralógia olyan fogalmak, melyeket a biológia számos területén már évtizedek óta alkalmaznak, ám sok esetben különböző, vagy ellentmondásos módokon (Patterson, 1988; Dickinson, 1995; Fitch, 2000; Jensen, 2001; Mindell and Meyer, 2001). Ezeket a fogalmakat mi Fitch (1970) útmutatása

alapján alkalmazzuk. Homológia: két karakter kapcsolata, melyek egy közös őstől származnak. Karakter lehet egy élőlény bármi nemű genetikai, strukturális vagy viselkedési jellege. Két gén (vagy géntermék) tehát homológ, ha egy közös őstől származnak. A homológia nem mennyiségi, minőségi jelleg, nincsen fokmérője. Két szekvencia ortológ, ha diverzifikációjuk fajképződési esemény után indult el, vagyis a közös ős gént az ortológ szekvenciákat hordozó fajok legutóbbi közös őse (cenancestor) hordozta. Ha ortológ szekvenciákat hasonlítunk össze, filogenetikai fájuk hűen tükrözi az azokat hordozó fajok leszármazási viszonyait. Ez kizárólag az ortológ szekvenciákra jellemző sajátság. Paralóg szekvenciák esetén azok diverzifikációja génduplikáció után indult el, melyet követhet, de nem szükségszerűen, fajképződési esemény. Paralóg viszony fennálhat szekvenciák között egy genomon belül, de fajok között is. Ortológok és paralógok kialakulását és egymáshoz való viszonyát az 1.6. ábra szemlélteti.



**1.6. ábra.** Ortológok és paralógok viszonya. Az egyes géneket fehér kitöltésű téglalapok jelölik az ábrán. Az ősi fajban (o) meglévő ősi gén (A) duplikációja révén létrejött két kópia: A1 és A2. Az ősi faj tovább fejlődött, és fajképződés útján létrejött az x és a y jelű faj, melyek szintén hordozzák (szaggatott vonallal körül véve) az A1 és A2 gén 1-1 (szekvencia diverzifikáció után) rájuk jellemző kópiáját. Az x és y faj génjei közül A1<sup>x</sup>-A2<sup>x</sup>, A1<sup>x</sup>-A2<sup>y</sup>, A2<sup>x</sup>-A1<sup>y</sup> és A1<sup>y</sup>-A2<sup>y</sup> paralóg párt alkotnak, A1<sup>x</sup>-A1<sup>y</sup>, illetve A2<sup>x</sup>-A2<sup>y</sup> pedig ortológok. Jensen (2001) nyomán, módosítva.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Számos olyan növényi gén ismert már, mely a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához elengedhetetlen. Ezek némelyikét csoportunkban azonosították. Jelenleg is ezek vizsgálata jelenti a csoport elsőszerű kutatási területét. Az együttélést meghatározó új növényi gének felkutatásán és funkcionális jellemzésén túl, a genomszekvenálási projektek előretörésének köszönhetően, munkánk mára már kiterjed ezen gének evolúciós elemzésére is. Tudni szeretnénk, mi teszi annyira különlegessé ezeket a növényeket, hogy képesek nitrogénkötő szimbiózist kialakítani, és miként tettek szert erre a képességre a szárazföldi növények törzsfajlódása folyamán.

A nitrogénkötő szimbiózisban résztvevő növényi gének evolúciós és funkcionális vizsgálata jelen munkában két nagy téma köré szerveződött. Ezek a következők:

I. A kiterjedt genomszekvenálási programoknak köszönhetően egyre több növényfaj teljes genomszekvenciája elérhető biológiai adatbázisokban. A nitrogénkötő szimbiózist meghatározó növényi gének homológjai után kutatva ezen adatbázisokban nem csupán nitrogénkötő gümő kialakítására képes, de arra képtelen fajokban is találatokat kapunk. E gének által kódolt fehérjék összevetésével arra keressük a választ, vajon hogyan specializálódtak az egyes szimbiózisban szerepet játszó gének az evolúció folyamán. Mennyire konzerváltak, illetve mennyire jellemző az egyes szimbiotikus génhomológok jelenléte nitrogénkötő szimbiózisra képtelen növényekben is. A jelen munkában bemutatott vizsgálataink célja volt:

1. A nitrogénkötő szimbiózisban szerepet játszó gének feltételezett ortológjainak összegyűjtése kész vagy közel kész genomszekvenálási programmal rendelkező zárvatermő növényi genomokból.

2. A feltételezett ortológ szekvenciák konzerváltságának meghatározása, és az evolúciójuk leírása. Azon gének meghatározása, melyek változása kulcsfontosságú volt a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepük ellátásához.

II. Egy, a csoportunk által leírt, a nitrogénkötő szimbiózis kialakításában nélkülözhetetlen szerepet betöltő gén a *LIN*, ami egy E3 ubikvitin ligáz kódol. Szekvencia adatbázisokban *LIN* homológ szekvenciák után kutatva megtudtuk, hogy a génnek létezik egy paralógja, amit *LIN2*-nek neveztünk el. A paralóg génről kísérletes adat korábban még nem állt rendelkezésre, ezért célunk volt:

1. *LIN* és *LIN2* evolúciós történetének feltárása.
2. A *M. truncatula LIN2* funkcionális vizsgálata.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Bioinformatikai módszerek

Munkánk során analíziseket végeztünk több faj számos DNS és fehérje szekvenciájának felhasználásával. Az adatbányászat, a szekvenciák összerendezése és minőségellenőrzése mellett a szekvencia elemzés részleteit mutatom be ebben az alfejezetben.

##### 3.1.1. Adatgyűjtés

*M. truncatula* szimbiotikus fehérjék aminosav szekvenciáit, illetve bizonyított szimbiotikus funkcióval nem rendelkező szekvenciákat, mint kontrollokat használva publikus szekvencia adatbázisokban kereséseket végeztünk, hogy kiválaszthassuk a legjobban illeszkedő találatokat, a kereső szekvenciák feltételezett ortológjait. Ezek azonosítóit a megfelelő kiegészítő információval együtt a Mellékletek fejezet 10.1. táblázatában soroltuk fel. A kereséseket a következő adatbázisokban végeztük: GenBank Non-redundant protein sequences (nr), Nucleotide collection (nr/nt), Reference genomic sequences (refseq\_genomic), High throughput genomic sequences (HTGS), Expressed sequence tags (est) és Whole-genome shotgun contigs (wgs) a National Center for Biotechnology Information (NCBI) honlapján (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a Phytozome adatbázisban (<http://www.phytozome.net/search.php>) és a Similarity Matrix of Proteins elemei között (SIMAP) (<http://liferay.csb.univie.ac.at/portal/web/simap/>) (Rattei et al., 2009). A kigyűjtött szekvenciák többsége az NCBI adatbázisából származik, azonban több esetben hasznunkra voltak a Phytozome adatbázisában elérhető, wgs szekvenciákon készült automatikus génpredikciók is. A SIMAP elemei között számos adatbázis aminosav szekvenciái találhatók meg egymáshoz való hasonlóságuk alapján mátrixba rendezve. A SIMAP kereséseket azért végeztük el, hogy megbizonyodhassunk, a kereső szekvenciánkhoz a kiválasztott legjobb találatnál hasonlóbb fehérjét más, általunk nem vizsgált adatbázisban sem találhatunk.

Azokban az esetekben, amikor szakirodalomban közölt *M. truncatula* aminosav szekvencia nem állt rendelkezésünkre, publikált *L. japonicus* (CRE1, KLV, PIR1) vagy *A. thaliana* (MAG1, AGT1, DH, EIF3K, ATPQ, TAFII15, ATP7 és RRMP) szekvenciák segítségével kerestük meg, illetve prediktáltuk a *M. truncatula* szekvenciát, melyet a további

keresésekhez használtunk. A keresések a blastp és tblastn algoritmusokkal történtek, alapbeállításokkal. A *M. truncatula* fehérjék feltételezett ortológjait a következő fajokban kerestük: *Pisum sativum* (Ps), *Lotus japonicus* (Lj), *Cucumis sativus* (Cs), *Populus trichocarpa* (Pt), *Carica papaya* (Cp), *Arabidopsis thaliana* (At), *Vitis vinifera* (Vv), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Oryza sativa* (Os) és *Zea mays* (Zm).

### 3.1.2. A szekvenciák minőségellenőrzése és javítása

Kísérletesen igazolt vagy prediktált aminosav szekvenciák számos esetben elérhetőek voltak az adatbázisokban, ezeket blastp keresésekkel megtalálhattuk. A DNS szekvencia szinten azonosított homológok esetében magunk prediktáltuk a kódoló DNS illetve aminosav szekvenciát. A predikciókat a Softberry honlapon elérhető (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) FGENESH+ program (Salamov and Solovyev, 2000) segítségével a legjobb tblastn találatokon végeztük, a *M. truncatula* keresőszekvencia, mint templát felhasználásával. Minden (az adatbázisokban elérhető vagy általunk végzett) predikciót homológjaival többszörös illesztésben összehasonlítva ellenőriztünk, és ahol szükséges volt, manuálisan javítottunk. Azokban az esetekben, ahol az adatbázisban elérhető aminosav szekvenciát javítottunk, az eredeti szekvencia azonosítója zárójelben szerepel a 10.1. táblázatban.

A munkánkban elemzett szekvenciák három féle eredetűek lehetnek: (1) aminosav szekvenciák, amiket az adatbázisban talált formában, módosítatlanul vizsgáltunk, (2) fehérjék, ahol a javítás egy megváltozott hosszú szekvenciát eredményezett (a homológok többszörös illesztésébe jobban illeszkedő alternatív kezdő metionin), és (3) azok a szekvenciák, melyek esetében semmilyen, vagy nagyon eltérő szekvencia predikció volt csupán elérhető az adatbázisokban. Ez utóbbi kategóriába tartozó aminosav szekvenciák predikcióit magunk végeztük el, amit több esetben megelőzött az adott DNS régió szekvenciájának genomi vagy EST szekvencia darabokból való összerendezése, a megfelelő konszenzus meghatározása. A DNS szekvenciák összerendezése, majd a kódoló szakaszok megállapítása során a homológ fehérjék többszörös illesztését vettük alapul, és a végső predikciókat is abban ellenőriztük. Szekvenálási hiányosságok miatt egyes, ebbe a kategóriába tartozó fehérje szekvenciák részlegesek, ezt minden említésükkor megfelelően jelöltük a dolgozatban.

Minden *M. truncatula* fehérjéhez minden vizsgált fajból összesen egy legjobb találatot választottunk, melyet később az összehasonlításokban használtunk. Ahol több hasonló találatot is kaptunk, a szekvencia szinten, és hossz alapján leghasonlóbbat választottuk ki. Reciprok BLAST keresésekkel teszteltük a kereső fehérje és kiválasztott leghasonlóbb homológja közötti

feltételezett ortológ kapcsolatot. A kiválasztott fehérjével keresést indítottunk az eredeti keresőszekvenciát is tartalmazó *M. truncatula* szekvencia gyűjteményben. Csak abban az esetben tartottuk meg az ortológ kapcsolat feltételezését, ha ez a keresés legjobb találatként az eredeti *M. truncatula* keresőszekvenciát hozta ki.

### 3.1.3. Szekvencia összehasonlítások, filogenetikai analízis és szinténia vizsgálat

A 4.3. táblázathoz elvégzett páronkénti összehasonlításokat, illetve a fehérje predikciók ellenőrzéséhez végzett többszörös illesztéseket a Vector NTI 10.3.0 programcsomag (Invitrogen) AlignX programjával készítettük. A szekvencia összehasonlításokban a blosum62mt2 pontozó mátrixot használtuk.

A 4.9. ábrához az aminosav szekvencia illesztéseket és a filogenetikai fát a MEGA v5.05 programmal (Tamura et al., 2011) készítettük. A ClustalW alapú illesztés Gonnet fehérje súlyozó mátrixot használt. A Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukcióhoz a p-distance modellt alkalmaztuk. A páronkénti távolságok számolása során a gapeket páronként távolítottuk el (pairwise deletion). A kládok támogatottságát nemparaméteres bootstrap módszerrel becsültük meg, 1000 ismétlést végezve.

A *LIN* és *LIN2* ortológok genomi környezetének összehasonlítását a SyMAP v4.0 programmal (Soderlund et al., 2006; Soderlund et al., 2011) végeztük, a gének 1-1 Mbp-os környezetén. Az összehasonlításhoz a program alapbeállításait alkalmaztuk. A felhasznált szekvencia információ a következő összerendezett genom verziókból származik: Mt4.0 (*M. truncatula*), build 2.5 (*L. japonicus*), JGI v3.0 (*P. trichocarpa*), Genoscope 12X (*V. vinifera*), SL2.40 (ITAG2.3 Release) (*S. lycopersicum*), MSU Release 7.0 (*O. sativa*), RefGen\_v2 (*Z. mays*).

### 3.2. Laboratóriumi anyagok és módszerek

Ebben az alfejezetben a laboratóriumi munkának a kísérletek reprodukálhatósága szempontjából általunk fontosnak tartott részfeladatait részletezem. Egyéb esetekben Sambrook és Russell (2001) útmutatásai voltak irányadóak munkánk során.



### **3.2.1. Nukleinsav izoláció és szintézis**

#### **3.2.1.1. Növényi RNS tisztítás és cDNS szintézis**

RNS izolációhoz csak frissen szedett, vagy szedés után azonnal folyékony nitrogénben fagyasztott, és felhasználásig -80 °C-on tárolt növényi anyagot használtunk. A NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel) készlet segítségével 100 mg növényi anyagból kiindulva teljes RNS-t izoláltunk. Az esetleges genomi DNS szennyeződés eliminációja érdekében, az RNS-t még az izolációs protokoll folyamán (a gyártó útmutatásait követve) DNáz kezelésnek vetettük alá. Az RNS mennyiségét egy ND-1000 (NanoDrop) spektrofotométeren ellenőriztük. A komplementer DNS-t (cDNS) 1 µg RNS felhasználásával a SuperScriptIII First-Strand (Invitrogen) készlettel, oligo dT primer alkalmazásával írtuk át.

#### **3.2.1.2. Növényi genomi DNS izolálás**

Genomi DNS tisztításához frissen szedett, vagy folyékony nitrogénben fagyasztott, majd -80 °C-on tárolt leveleket és gyökereket használtunk. A DNS tisztítást egy QuickGene-Mini80 (Fujifilm) extrakciós állványon végeztük a QuickGene DNA tissue kit S (DT-S) (Kurabo) készlet felhasználásával a gyártó protokolljának kismértékű módosításával. A készlet szöveti lízis puffere helyett a növényi anyagot 300 µl CTAB pufferben dörzsöltük el kvarchomokkal, és 56 °C-on 1 órát inkubáltuk. Ezután a sejttörmeléket centrifugálással leüleptítettük (5 min, 16000 g), és a felülúszó 200 µl-ét, ettől kezdve a gyári utasításokat követve, a DT-S készlet LDT puffer/etanol elegyével kezeltük. A tisztított DNS oldatot végül 1/40 térfogat 10 mg/ml RNázal 15 percig kezeltük, szobahőmérsékleten. A genomi DNS-t PCR reakciókhoz használtuk. A CTAB puffer összetétele: 2 m/V% CTAB, 0,1 M Tris (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl vízben oldva. Közvetlenül felhasználás előtt frissen adtunk a pufferhez 0,5 V/V% végkoncentrációig tömény β-merkapto-etanol.

### **3.2.2. Klónozások**

A kísérleteinkben alkalmazott valamennyi konstrukciót a λ-fág helyspecifikus rekombinációs képességét kihasználó Gateway klónozó rendszerben (Invitrogen) készítettük (Hartley et al., 2000). Ehhez a klónozni kívánt DNS darabot polimeráz láncreakcióval (PCR)

amplifikáltuk. A templátként használt cDNS és gDNS 3.2.1.1. és 3.2.1.2. a fejezetek szerint készültek. Klónozási munkákhoz a Phusion Hot Start II High-Fidelity (Finnzymes), a PfuUltra II Fusion HS (Stratagene), vagy a Herculase II Fusion (Stratagene) 3'-5' hibajavító exonukleáz képességgel rendelkező, így kis hibával másoló DNS polimerázokat használtuk, a gyártók által meghatározott protokollok szerint. A reakciókat egy Mastercycler epgradient S (Eppendorf) készülékben futtattuk.

### 3.2.2.1. A donor konstrukciók

A vizsgálni kívánt DNS szakaszokat először donor vektorba klónoztuk a pCR8/GW/TOPO TA klónozó készlet (Invitrogen) segítségével. A *M. truncatula* LIN2 kódoló szekvenciát (*cMtLIN2*) szimbiontával nem fertőzött *M. truncatula* gyökérből készült cDNS-en amplifikáltuk. Ehhez a 5'-ATGAACACAACACGAAGTCAAATC-3' és 5'-ATTCATT TCCCAAGCCTGAATTTG -3' primereket használtuk. A *M. truncatula* intronokat is tartalmazó genomi szekvenciáját (*gMtLIN2*) *M. truncatula* genomi DNS-en amplifikáltuk, a 5'-ATGAACACAACACGAAGTCAAATC-3' és 5'-ATTCATT TCCCAAGCCTGCAATAAC-3' primerek segítségével. Az *A. capillus-veneris* páfrány LIN homológ kódoló szekvenciáját (*cAcvLINh*) hordozó plazmidot megkapuk az azt előállító japán csoporttól (Yamauchi et al., 2005), és megszekvenáltuk. Ezen amplifikáltuk az *in silico* predikció alapján transzlálódó szakaszt. A *cAcvLINh* klónozásához felhasznált PCR primerek a 5'-ATGACTC CTGCAGGTTCCCTC-3' és 5'-TCCAGCTGTCCATCTCCTTATTTTTC-3' voltak. A *M. truncatula* LIN kódoló szekvencia (*cMtLIN*) korábbi kísérletek kapcsán már rendelkezésünkre állt (Kiss et al., 2009). A *M. truncatula* LIN2 kifejeződési mintázatának (*pMtLIN2*) vizsgálatához, gDNS-ről klónoztuk a gén transzlálódó szakaszát közvetlenül megelőző 2156 bázispárt, amit *M. truncatula* LIN2 promóterként használtunk a kísérletekben. Ehhez a következő PCR primereket használtuk: 5'-CTTCCCACACTAAACACCATAAGC-3' és 5'-GGCGGTGGTTTTTGATCG-3'.

### 3.2.2.2. A célvektorok

Célvektorként leggyakrabban a Genti Egyetemen létrehozott növényi Gateway célvektorokat (Karimi et al., 2007), illetve azok módosított változatait használtuk. A pK7WG2D vektorról a géntermék szabadon, fúziós fehérje nélkül termeltethető a karfiol mozaik vírus konstitutív génexpressziót biztosító promóterével (*p35S*) meghajtva (Hohn et al., 1982). Ezen túl

a vektorról szabad EGFP fehérje, mint fluoreszcens transzformációs kontroll is termelődik. A pK7WGF2-RR vektorról egy fúziós fehérje termelődik, ahol a klónozott gén terméke N-terminálisán egy fluoreszcens EGFP jelölő molekulát (tag) hordoz. Ebben az esetben transzformációs kontrollként szabad DsRed termelődik. A pK7WGF2-RR vektoron is *p35S* hajtja meg a klónozott szekvencia kifejeződését. A *M. truncatula LIN* (*pMtLIN*) és *LIN2* (*pMtLIN2*) promóterek funkcionális vizsgálatához létrehoztuk a pK7WGF2-RR-pLIN és pK7WGF2-RR-pLIN2 vektorokat, ahol a *p35S*-t *pLIN*-re, illetve *pLIN2*-re cseréltük a pK7WGF2-RR vektoron. A pK7WGF2-RR-pLIN vektor korábbi kísérletek kapcsán már rendelkezésünkre állt (Kiss et al., 2009), de a vektorral készült konstrukciók növény transzformációja után a transzformációs kontroll DsRed ismeretlen okok miatt nem, vagy csak nagyon gyengén, illetve nagyon ritkán volt látható a kísérleti növényekben (a kísérleti növények többsége nagyon halványan, vagy egyáltalán nem mutatott DsRed expressziót, csak kivételes esetekben tapasztaltunk jól látható DsRed kifejeződést). Ekkor újra elkészítettük a pK7WGF2-RR-pLIN vektort, ám újra nem kaptunk rendszeres, kimutatható transzformációs kontroll expressziót, bár ellenőrző PCR, és a *DsRed* szekvencia szekvenálása is megerősítette az ép transzformációs kontroll jelenlétét a vektoron. Ennek ellenére a transzgének működtek a komplementációs tesztekben, de a fenti okok miatt a pK7WGF2-RR-pLIN vektor felhasználásával készített konstrukciók esetében nem tudtuk meghatározni a transzformáns növények arányát a kísérletekben.

A pK7WGF2-RR-pLIN2 vektor előállításához először a pLIN2 szakaszt amplifikáltuk SpeI restriktions hasítóhelyet hordozó primerek segítségével. A primerek szekvenciája a következő volt: 5'-GGACTAGTCTTCCCACACTAAACACCATAAGC -3' és 5'-GGACTAGTGGC GGTGGTTTTTGTATCG-3'. Ezt az 5' és 3' végén 1-1 SpeI helyet hordozó DNS szakaszt először pGem-T Easy vektorba (Promega) klónoztuk, majd innen SpeI hasítással vágtuk ki. A SpeI-pLIN2-SpeI DNS fragmentet agaróz gélelektroforézis után a QIAquick Gel Extraction (Qiagen) készlet segítségével tisztítottuk. Ezzel párhuzamosan a pK7WGF2-RR vektort SpeI és HindIII emésztésnek vetettük alá (ez eltávolította a *p35S*-t), majd a megfelelő DNS szakaszt az előbbivel hasonló módon izoláltuk agaróz gélből. A tisztított SpeI-pLIN2-SpeI és HindIII-pK7WGF2-RR-SpeI szakaszokat T4 DNS ligázzal inkubáltuk, ekkor a vektor és a promóter SpeI ragados végei ligálódtak. Ezután a nem kompatibilis HindIII és SpeI ragados végeket Klenow fragment segítségével töltöttük fel. A vektort ezután T4 DNS ligázzal cirkularizáltuk.

A *LIN2* promóter kifejeződési mintázatát a pMDC164 célvektor segítségével vizsgáltuk. A klónozott promóter a vektorról *GUS* riportergént hajt meg. A fehérje lokalizációs kísérletekben pedig a pMDC43 vektort használtuk azokban az esetekben, amikor a szabad

DsRed zavarta volna az egyéb (kotranszformált) konstrukcióról kifejeződő lokalizációs kontroll detekcióját. A pMDC43 alkalmazásakor egy N-terminális GFP6 fluoreszcens jelölőmolekulával fúzióban termelődik a klónozott gén terméke, független fluoreszcens transzformációs kontroll azonban nem fejeződik ki a vektorról (Curtis and Grossniklaus, 2003).

### 3.2.2.3. A növény transzformációs konstrukciók és a transzformációk ellenőrzése

A pCR8/GW/TOPO donor vektorba klónozott szekvenciákat Gateway LR ClonaseII Enzyme mix (Invitrogen) segítségével rekombináltattuk a célvektorokba. A kész konstrukciókat először *Escherichia coli* törzsekben szelektáltuk, illetve amplifikáltuk, majd a megfelelő *Agrobacterium* törzsbe transzformáltuk, melyekkel azután elvégezhetjük a növény transzformációkat.

A tranziensen transzformált (3.2.4.2. fejezet) dohánylevelekben fluoreszcensen jelölt fehérjét vizsgáltunk lézer pásztázó mikroszkóppal. Az egyes konstrukciók jelenlétét a transzformált *M. truncatula* gyökerekben (3.2.4.1. fejezet) pedig egy Nikon SMZ800 sztereo mikroszkópon, Intensilight C-HGFIE (Nikon) fényforrás mellett, a fluoreszcens riportergén kifejeződése által ellenőriztük. Ezen túl ellenőrző PCR-eket is végeztünk a klónozott szekvenciákra specifikus primerekkel a transzformáns szövetekből izolált genomi DNS (lásd 3.2.1.2. fejezet), mint templát felhasználásával.

A megfelelő *MtLIN*, *LIN2* és *AcvLINh* szekvenciák komplementációs képességét a *lin-2* mutáns vonal növényein vizsgáltuk. Annak ellenőrzésére, hogy valóban homozigóta *lin-2* mutáns növényeken történt a komplementáció, a transzformáció után gümöző képességét visszanyert *lin-2* mutáns növények leveléből genomi DNS-t izoláltunk (lásd 3.2.1.2. fejezet), azon amplifikáltuk a mutációt hordozó szakaszt, majd szekvenáltuk azt. Az amplifikációhoz a 5'-ATGTCGGGGAATTCAGA-3' és 5'-ATTGGCAACATAGGAACAA-3' primereket használtuk.

### 3.2.3. A felhasznált baktérium törzsek

A klónozások során különböző *E. coli* törzseket használtunk az egyes plazmidok szelekciójához, amplifikációjához. A pCR8/GW/TOPO konstrukciókat One Shot Mach1-T1 (Invitrogen) sejtekbe transzformáltuk, míg a célvektorral készült konstrukciókat OmniMax 2T1 sejtekben amplifikáltuk. A pGem-T Easy vektorral készült konstrukciókat a vektor által támogatott, a *LacZ* gén  $\alpha$ -komplementációján alapuló kék-fehér kolónia szelekciós rendszernek

megfelelő (*lacZAM15*) XL-1 Blue törzsbe transzformáltuk. Az üres (donor vektorral nem rekombinálatott) célvektorokat DB3.1-es törzsbe transzformáltuk, ott amplifikáltuk. Ez a törzs képes életben maradni, és szaporodni az üres célvektorok klónozó helyén hordozott, és onnan kifejeződő *ccdB* toxin gén jelenlétében is.

A növény transzformációkhoz *Agrobacterium* törzseket használtunk. A tranziens levéltranszformációkhoz azt az *A. tumefaciens* C58C1-es törzset, ami a pCh32-es plazmidon az alap törzshöz képest további virulencia géneket hordoz, így hatékonyabban transzformálja a növényi sejteket (Hamilton et al., 1996). A „hairy root” gyökértranszformációkhoz az *A. rhizogenes* Arqual törzset használtuk.

A szimbiózis vizsgálatokban inokuláló törzsként a *M. truncatula*-t hatékonyan fertőző, azzal funkcionális nitrogénkötő szimbiózist kialakítani képes *Sinorhizobium medicae* WSM419 törzs *LacZ* illetve *mRFP* gént kifejező vonalait használtuk.

#### **3.2.3.1. Baktérium transzformációk, a baktériumok tenyésztése**

A DNS konstrukciókat különböző *E. coli*, illetve *Agrobacterium* törzsekbe transzformáltuk. Ezek lehetnek kémiai-, vagy elektrokompetens sejtek. Kémiai kompetens sejtek esetén a transzformáló DNS bejuttatása hősokkal (42 °C, 45 s) történt, elektro kompetens sejtek esetén pedig feszültség sokkot alkalmaztunk (2,5 kV, ~ 4 ms), 2 mm-es elektróda távolságú elektroporáló küvettákban (Bio-Rad), egy *E. coli* Pulser (Bio-Rad) készüléken.

Megfelelő antibiotikum szelekció mellett az *E. coli* törzseket LB táptalajon, 37 °C-on növesztettük, az *Agrobacterium* és *Rhizobium* törzseket TA táptalajon, 28 °C-on.

#### **3.2.4. Növény transzformációs módszerek**

A növény transzformációkat két féle rendszerben végeztük. *M. truncatula* növényeken az ún. „hairy root” gyökértranszformációs technikát használtuk (Boisson-Dernier et al., 2001), a fluoreszcensen jelölt fehérjék vizsgálatát pedig a gyors eredményt adó dohány levél tranziens transzformációkkal (Agroinfiltráció) végeztük (Yang et al., 2000).

#### 3.2.4.1. *A. rhizogenes* közvetített gyökértranszformációk

A promóter analízis és komplementációs kísérletekhez gyökértranszformációkat végeztünk *M. truncatula* A17 Jemalong vad típusú és *lin-2* mutáns (Kiss et al., 2009) növényeken. A módszer kiméra egyedeket eredményez: transzformáns gyökerekkel és nem transzformáns hajtással.

##### 3.2.4.1.1. A *M. truncatula* magok csíráztatása

A magokat először tömény kénsavval kezeltük 5 percen keresztül, majd steril 4 °C-os vízzel mostuk. Ezután 5 m/m%-os nátrium-hipoklorit oldatban fertőtlenítettük 10 percig, majd újra steril desztillált vízzel mostuk, és 4 °C-on vízzel duzzasztottuk 1 napon keresztül. A megduzzadt magokat 0,8 m/V%-os vizes agar lemezekben, alufóliával sötétítve, 4 °C-on csíráztattuk legalább 3-4 napig (így a csírák lassabban növekedtek, de a későbbi csírázásnak indult magok sem maradtak le jelentősen a méretüket tekintve).

##### 3.2.4.1.2. A *M. truncatula* növények transzformációja és nevelése

A megfelelő konstrukciókat hordozó *A. rhizogenes* Arqual törzseket minden kísérlet előtt szilárd (2,5 m/V% agar) TA táplemezen frissen növesztettük fel. A transzformációhoz a csíranövények gyököcskéjét kb. 2 cm-esre vágtuk vissza, majd a vágási felszínt az *Agrobacterium* pázsiton elhúztuk. A csíranövényeket ezután 1,2 m/V% agarral készült, 5 mM KNO<sub>3</sub>-tal kiegészített FahreusN- táptalajon neveltük. A FahreusN- (nitrogén mentes Fahreus) tápoldat összetétele: 0,7 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 M MgSO<sub>4</sub>, 0,9 M CaCl<sub>2</sub>, 20 µM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub> (Fe-citrát), 1,6 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,6 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,5 µM NaMoO<sub>4</sub>, 0,6 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0,6 µM MnSO<sub>4</sub> vízben oldva (pH 6,8). A transzformált csíranövények növényszobában, hosszú nappalos fényviszonyok mellett (16:8 h, nappal:éjszaka) 25 °C-on fejlődtek 3 hétig, majd cserepekbe, sterilizált agyaggolyók közé ültettük azokat, ahol újabb 4 héten keresztül fejlődtek hosszúnappalos körülmények között, üvegházban (22-25 °C). A cserepekben tartott növényeket 3 hétig hetente egyszer 5 mM KNO<sub>3</sub>-tal kiegészített FahreusN- tápoldattal kezeltük. A transzformált növényeket minden esetben szimbiontákkal fertőztük (lásd 3.2.5. fejezet), ezért a negyedik héttől kezdődően megvontuk a nitrogént a tápoldatból.

### 3.2.4.2. *Nicotiana benthamiana* tranziens levéltranszformációk

Szubcelluláris lokalizációs elemzésekhez a vizsgálni kívánt fehérjéket dohány növények levelében fejeztettük ki. A kísérletekhez 5-8 hetes, üvegházi körülmények között nevelt *N. benthamiana* növényeket használtunk. A magokat általános virágföldbe vetettük, majd a növényeket 2 hét után egyenként Jiffy tőzegkorongokba tűztük át. Ezeket újabb két hét elteltével virágfölddel cserepekbe ültettük. A transzformáló konstrukciókat hordozó *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pCh32) törzseket TA táplemezen növesztettük fel, majd spatulával összegyűjtöttük, és infiltráló pufferben felszuszpendáltuk. Az infiltráló puffer összetétele: 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM MES, 150  $\mu$ M acetosziringon steril vízben oldva. A tranziens transzformáció hatékonyságának növelésére egy ún. segéd plazmidot hordozó C58C1 törzset használtunk. Ebben a pBin61S plazmidról fejeződik ki a P14 fehérje, ami az RNS csendesítés hatékony szupresszora (Merai et al., 2005). Szubcelluláris lokalizációs kontrollként ko-transzformációkat végeztünk olyan C58C1 törzsekkel, melyek a pBIN20 plazmidról különböző sejtalkotókba (ER, Golgi, plazmalemma) lokalizáló mCherry fúziós fehérjéket fejeznek ki (Nelson et al., 2007). A transzformációk során azonos arányban alkalmaztuk valamennyi transzformáló, és a helper plazmidot hordozó törzset is, az infiltráló szuszpenzió végső koncentrációját úgy állítottuk be, hogy minden bekevert baktérium törzsre 0,4 legyen a folyadék 600 nm-en mért optikai denzitása ( $OD_{600}$ ). A dohánylevelek transzformációját 1 ml-es fecskendővel végeztük, a levelek fonáka felől. A transzgén(ek) expresszióját 3 nap múlva vizsgáltuk konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (lásd 3.2.8.)

### 3.2.5. A *M. truncatula* növények *Rhizobium* inokulációja

A szimbionta inokulációt egy hétig nitrogén éheztetett *M. truncatula* növényeken hajtottuk végre. A megfelelő *Rhizobium* törzset frissen növesztettük szilárd TA táplemezen, majd a baktérium pázsitot felkapartuk, és FahreusN- oldatban szuszpendáltuk, azzal inokuláltunk. A promóter analízis kísérletekhez mintát gyűjtöttünk közvetlenül fertőzés előtt, és *Rhizobium* inokuláció után 1, 3, 7, 21 és 28 nappal, a komplementációs teszteket, és a *lin2* mutánsok gümöztési tesztjeit a növények inokulációja után 6 héttel értékeltük ki.

### 3.2.6. A *M. truncatula* *lin2* mutánsok

A *M. truncatula* *lin2* mutánsok egy-egy Tnt1 retrotranszpozon inszerciót (d'Erfurth et al., 2003; Cheng et al., 2011) hordoznak a *LIN2* génben. A vizsgálatainkban felhasznált *lin2* növények genotípusának meghatározását PCR segítségével végeztük *lin2-1* és *lin2-2* mutáns növények leveléből izolált genomi DNS-en (lásd 3.2.1.2. fejezet). Ehhez egy Tnt1 specifikus primert, és az adott inszerció helyét lefedő szakaszt amplifikáló *LIN2* specifikus primereket használtunk. A Tnt1 specifikus primer csak mutáns allélról ad PCR terméket a megfelelő *LIN2* primerrel, míg a *LIN2* specifikus primer párral csak a vad allélról amplifikálhatjuk az annak megfelelő hosszúságú fragmentet. A *M. truncatula* Tnt1 retrotranszpozon inszerciós mutáns adatbázisban (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>) elérhető Tnt1-farok szekvenciák alapján tudtuk, milyen orientációban inszertálódott a transzpozon a genomi szekvenciába, így a Tnt1 specifikus primert elég volt csupán az egyik génspecifikus primerrel tesztelni. A mutáns és vad típusú allélok megkülönböztetéséhez a következő primer párokat használtuk: 5'-TCTGGA TGAATGAGACTGGAGG-3' és 5'-ATGAACACAACACGAACTCAAATC-3' (*lin2-1* allél), 5'-ATGAACACAACACGAACTCAAATC-3' és 5'-CCAATCATCCCATCAACAGTG-3' (a *lin2-1* Tnt1 inszerció helyét lefedő vad típusú *LIN2* szekvencia), 5'-TCTGGATGAATGAGA CTGGAGG-3' és 5'-CTGAATTTGTCCATCTGAAGTTCC-3' (*lin2-2* allél), 5'-GTGAAGTG CTTGGCTCATGC-3' és 5'-CTGAATTTGTCCATCTGAAGTTCC-3' (a *lin2-2* Tnt1 inszerció helyét lefedő vad típusú *LIN2* szekvencia). A PCR-eket a Phire Hot Start II (Finnzymes) DNS polimerázzal végeztük. A gümözüsi és gyökérfejlődési tesztekben homozigóta *lin2* mutáns növényeket használtunk.

#### 3.2.6.1. A *lin2* mutánsok gümözüsi tesztje

A *lin-2* mutáns (*lin2-1* és *lin2-2*) *M. truncatula* magokat a 3.2.4.1.1. fejezet szerint csíráztattuk, majd sterilizált agyaggolyók közé ültettük, és üvegházban, hosszúnappalos körülmények között neveltük. Inokulációhoz *S. medicae* WSM419-et használtunk a 3.2.5. fejezet szerint. A mutánsok gümözüsi képességét inokuláció után 6 héttel ellenőriztük.



### 3.2.7. Hisztokémiai festések

Promóter analízis vizsgálatokban, továbbá a szimbiotikus infekció hatékonyságának ellenőrzéséhez gyökér, illetve gümő festéseket végeztünk a *LacZ* ( $\beta$ -galaktozidáz) riportergént kifejező szimbionta, illetve a *promóter-GUS* ( $\beta$ -glükuronidáz) riportergén konstrukciót hordozó növényi sejtek riportergén aktivitásának láthatóvá tételéhez. A festéseket frissen szedett egész szerveken, illetve félbevágott gümőn vagy 60  $\mu$ m-es metszeteken végeztük. A metszeteket 1x PBS pufferben oldott (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 liter vízben oldva, pH 7,4) 4 m/V%-os agarózba ágyazott gümőkől egy MICROM HM 650 V (Thermo Scientific) mikrotómon készítettük. A festések kiértékelését és dokumentációját egy Leica DM LB2 típusú fénymikroszkópon, egy MicroPublisher 3.3 RTV (QImaging) fotó feltétellel végeztük a QCapture Pro (5.1.1.14, QImaging) szoftver segítségével.

#### 3.2.7.1. $\beta$ -glükuronidáz (GUS) festés

A mintát 15 percig 1x PBS pufferben mostuk, majd festettük. A festőoldat összetétele 1 ml végtérfogatban: 880  $\mu$ l 1x PBS, 50  $\mu$ l 100 mM K-ferrocianid, 50  $\mu$ l 100mM K-ferricianid, 20  $\mu$ l 50 mM (DMF-ban) X-Gluc (Duchefa Biochemie, kék terméket ad)/ Magenta-Gluc (Duchefa Biochemie, magenta színű terméket ad). Ha nem metszetet festettünk, akkor először a festőoldatot vákuum alatt 30 percig infiltráltuk a szövetekbe, csak ezután következett a festőoldat és a minta inkubációja, 37 °C-on, egy éjszakán át. Festés után 15 percig 1x PBS-ben mostuk a mintát, majd 4 °C-on 70 V/V%-os etanolban tároltuk kiértékelésig. Amennyiben egyszerre szeretnénk volna látni a *GUS* és a *LacZ* gén működését is, kettős festést végeztünk. Ilyenkor a GUS festés után közvetlenül következett az X-Gal festés. Mivel az X-Gal festésnél alkalmazott szubsztrát kék színű terméket ad, kettős festések alkalmával a magenta terméket adó Magenta-Gluc szubsztrátot használtuk a GUS festés során.

#### 3.2.7.2. $\beta$ -galaktozidáz (X-Gal) festés

Az 1x PBS pufferben 15 percig mosott növényi mintát 1,5 V/V% (1x PBS-ben oldva) glutáraldehidben fixáltuk 90 percen keresztül (nem metszett minta esetén állandó vákuum alatt). Ezután háromszor 5 percig újra 1x PBS-ben mostuk a mintát, majd a festés következett. A festőoldat összetétele 1 ml végtérfogatban: 860  $\mu$ l 1x PBS, 50  $\mu$ l 100 mM K-ferrocianid, 50  $\mu$ l

100mM K-ferricianid, 40 µl 2 m/V% (DMF-ban) X-Gal (Duchefa Biochemie, kék színű terméket ad). A festést szükség esetén 30 perc vákuumos infiltráció után végeztük (ha nem metszetet festettünk), 37 °C-on, a túlfestés elkerülése érdekében a színreakció folyamatos ellenőrzése mellett. 15 perc 1x PBS mosást követően a festett szöveteket 4 °C-on 70 V/V%-os etanolban tároltuk kiértékelésig.

### 3.2.8. Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat egy Leica SP5 AOBS konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, egy DMI6000 mikroszkóp alapon végeztük. A mikroszkóp beállításai a következők voltak: objektív lencsék: HCX PL FLUOTAR 5x DRY (NA:0.15), HC PL FLUOTAR 10x DRY (NA:0.3) és HCX PL APO CS 20x DRY (NA:0.7), mintázási sebesség: 400 Hz, line averaging: 1-8; pinhole: 1 airy unit, kétirányú pásztázó mód, gerjesztés: 488 nm (Ar lézer, EGFP) és 543 nm (HeNe lézer, DsRed), spektrális emissziós detektorok: 500-540 nm (EGFP) és 580-649 nm (DsRed). Az EGFP és DsRed képek zöld illetve piros pszeudo-színezést kaptak. A képek feldolgozása a LAS AS Lite (v2.2.1 build 4842, Leica) szoftver segítségével történt.

### 3.2.9. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A kvantitatív valós idejű PCR-ekhez nem inokulált, és Rhizobium inokuláció után 4 nappal gyűjtött A17 Jemalong *M. truncatula* gyökereket használtunk. Az RNS izoláció és a cDNS szintézise a 3.2.1.1. fejezetben leírtak szerint zajlott. A qRT-PCR reakcióhoz ABsolute qPCR SYBR Green Mix-et (Thermo Scientific) használtunk. A cDNS templátot 10-szeres hígításban, a primereket 2,5 nM koncentrációban alkalmaztuk. A reakció egy Bioer FQD-48A készülékben zajlott: 95 °C 15 min, majd 40 ciklus [95 °C 15 s, 62 (*LIN2*)/ 50 (*LIN*) °C 30 s, 72 °C 30 s]. A kiértékelést a LineGeneK programmal végeztük (fqdpcr v2.0, Bioer). A PCR amplifikáció specifikusságát a termékek végpont disszociációs analízisével ellenőriztük, illetve a termékeket agaróz gélen is megfuttattuk. Az eredményeket a  $\Delta\Delta CT$  módszerrel értékeltük. Belső referenciaként a *M. truncatula ACTIN2* gént használtuk. Az amplifikáció során a következő primer párokat használtuk: 5'-TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG-3' és 5'-ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAACC-3' (*ACTIN2*), 5'-TGGTTGCTCTGGTTA CAGC-3' és 5'-GTGAAAATATCTTTCCTGCGGTTG -3' (*LIN*), 5'-ATGAACACAAC ACGAACTCAAATC-3' és 5'-AGGATTGGAATGAAAGATTCTGAG -3' (*LIN2*).

## 4. EREDMÉNYEK

Az eredmények bemutatása során következetesen a fajnevek következő rövidítéseit alkalmazzuk: Mt - *Medicago truncatula*, Ps - *Pisum sativum*, Lj - *Lotus japonicus*, Cs - *Cucumis sativus*, Pt - *Populus trichocarpa*, Cp - *Carica papaya*, At - *Arabidopsis thaliana*, Vv - *Vitis vinifera*, Sl - *Solanum lycopersicum*, Os - *Oryza sativa*, Zm - *Zea mays*, Acv - *Adiantum capillus-veneris*, Sm - *Selaginella moellendorffii*.

### 4.1. *Medicago truncatula* szimbiotikus gének ortológjai zárvatermő növényekben

A nitrogénkötő szimbiózis kialakításában kulcsszerepet játszó növényi gének azonosítása az elmúlt évtized nemzetközi kutatómunkájának köszönhetően roham léptekkel haladt előre. Számos gént és génterméket azonosítottak, jellemezték a kiválasztott pillangósvirágú modellnövényekben: a *Medicago truncatula*-ban és a *Lotus japonicus*-ban. Eközben a DNS szekvenálási technológiák egyre hatékonyabbá és olcsóbbá válásával mára számos növény teljes genomszekvenciája is elérhetővé vált biológiai adatbázisokban. Ez lehetőséget teremtett számunkra a nitrogénkötő modellnövényekben már azonosított szimbiotikus gének, illetve géntermékek homológjainak felkutatására egymástól különböző rendszertani távolságra elhelyezkedő, gümöző és nem gümöző növényfajokban is.

#### 4.1.1. A vizsgálatba bevont gének kiválasztása

Vizsgálatunkhoz kiválasztottunk 16 *M. truncatula* gént, melyek fehérje termékei változatos szerepet töltenek be a nitrogénkötő szimbiózis kialakítása folyamán (pl. receptor kinázok, transzkripció faktorok). Ezek közül a *LYK3*, *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *DMI3*, *IPD3*, *NSP1*, *NSP2*, *ERN1*, *NIN*, *CRE1*, *LIN*, *RIT* és *PIR1* gének a szimbiózis kialakításának kezdeti szakaszaiban nélkülözhetetlenek, ún. korai szimbiotikus gének. Közülük a *DMI1*, *DMI2*, *DMI3* és *IPD3* gének abban is különlegesek, hogy ezek a szekvenciák szükségesek a mikorrhiza szimbiózis kialakítása során is, vagyis az ún. közös szimbiotikus útvonal (CSP) elemei. Két további gén, a *SUNN* és *KLV* a gümőszám autoregulációjában vesz részt, vagyis abban a

visszacsatolási folyamatban, mellyel a növény képes a gyökérzetén kialakuló szimbiotikus gümők optimális mennyiségét szabályozni a rendelkezésre álló energia (a fotoszintézis során előállított cukrok) és a szükséges nitrogén mennyiségének függvényében (Reid et al., 2011). A kiválasztott gének közül többen, kisebb vagy nagyobb gémcsalád tagjai, melyek a vizsgált fajok genomjában adott esetben eltérő tagszámmal vannak jelen, ezeknél külön figyelmet fordítottunk a szekvencia elemzésekre. Mivel elsődleges szempontunk a funkcióhoz köthető változások, eltérések szemléltetése volt, és ezek nagyrésze feltehetőleg a gének által kódolt fehérje termékekhez köthető, a homológok összehasonlító vizsgálatát a fehérjék szintjén végeztük. A vizsgálatba bevont 16 *M. truncatula* szimbiotikus szekvenciát összesen 13564 aminosav pozíció reprezentálja.

Ahhoz, hogy a szimbiotikus szekvenciák, illetve homológjaik összehasonlítása során kapott hasonlósági értékeket és lehetséges evolúciós trendeket megfelelően értelmezni tudjuk, összeállítottunk egy ún. kontroll csoportot is. Ebbe olyan géneket válogattunk, melyek nem rendelkeznek bizonyított szimbiotikus funkcióval, tehát konzerváltságukat, vagy éppen változásukat feltehetően nem befolyásolták a szimbiotikus szekvenciákat formáló evolúciós erők. 12 kontroll gént választottunk ki. Közülük az *RBCL*, az *ATPB* és a *MATK* rendszertani munkákban széles körben alkalmazott marker gének (Savolainen et al., 2000; Hilu et al., 2003; Wojciechowski et al., 2004), melyek a kloroplaszt genomjában kódoltak. A többi szekvencia sejtmagi kódolású. A *MAG1*, *AGT1*, *DH*, *EIF3K*, *ATPQ*, *TAFIII5*, *ATP7* és *RRMP* gének egyszeres kópiaszámmal azonosított szekvenciák az *A. thaliana*, a *P. trichocarpa*, a *V. vinifera* és az *O. sativa* genomban is, ezáltal potenciálisan jól alkalmazhatóak filogenetikai és szekvencia összehasonlító elemzésekben, különböző rendszertani szinteken is (Duarte et al., 2010). A *G6PDH* szekvencia egy általános háztartási gén, a glükóz-6-foszfát 1-dehidrogenázt kódolja, amely a pentóz foszfát útvonalon keresztül alapvető szerepet játszik a sejtek szénháztartásának szabályozásában (Kletzien et al., 1994). A 12 kontroll *M. truncatula* szekvenciát összesen 3828 aminosav pozíció reprezentálja a vizsgálatunkban.

#### **4.1.2. A vizsgálatba bevont fajok kiválasztása**

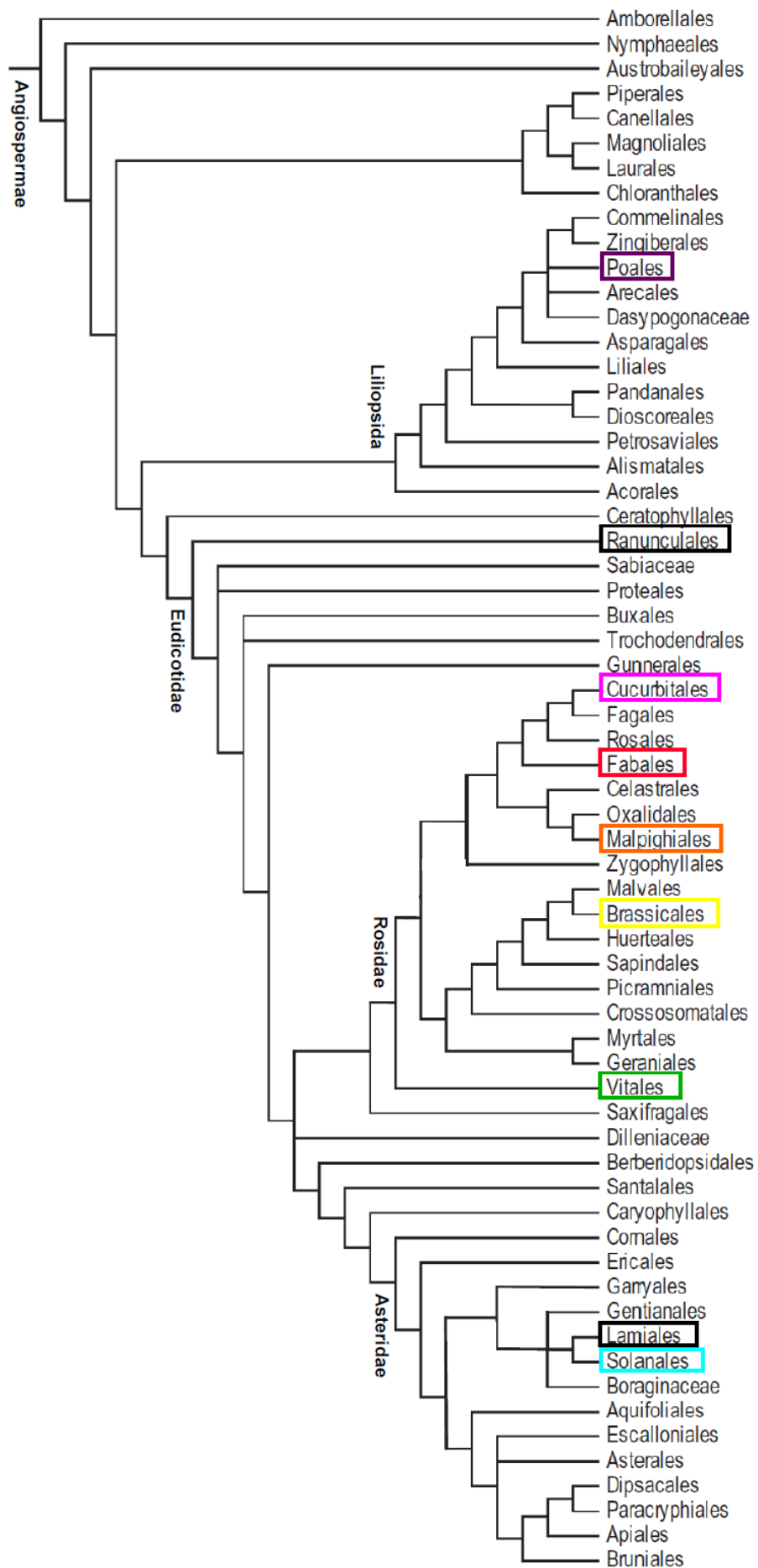
A vizsgált növényi genomok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy elérhető genomszekvenciájuk minél teljesebb legyen, ezáltal minimalizálva annak a lehetőségét, hogy egy adott homológ szekvenciát ne találjunk meg csupán azért, mert az az adott genom még nem szekvenált régiójára esik. 10 fajt választottunk a zárvatermő növények rendszertani fájának különböző részeiről, melyek genomszekvenálása már befejezett, vagy közel befejezett fázisban

tartott, hogy génjeik között felkutassuk a kiválasztott *M. truncatula* (Fabales) (Young et al., 2011) géntermékekhez leghasonlóbb homológ szekvenciákat. A kiválasztott fajok a következők voltak: kerti borsó (*Pisum sativum*, *Ps*, Fabales), *L. japonicus* (*Lj*, Fabales) (Sato et al., 2008), uborka (*Cucumis sativus*, *Cs*, Cucurbitales) (Huang et al., 2009), amerikai fekete nyár (*Populus trichocarpa*, *Pt*, Malpighiales) (Tuskan et al., 2006), papaja (*Carica papaya*, *Cp*, Brassicales) (Ming et al., 2008), lúdfű (*Arabidopsis thaliana*, *At*, Brassicales) (Swarbreck et al., 2008), bortermő szőlő (*Vitis vinifera*, *Vv*, Vitales) (Jaillon et al., 2007), paradicsom (*Solanum lycopersicum*, *Sl*, Solanales) (The Tomato Genome Consortium, 2012), rizs (*Oryza sativa*, *Os*, Poales) (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002) és kukorica (*Zea mays*, *Zm*, Poales) (Schnable et al., 2009). A vizsgált fajok rendszertani kapcsolatait a 4.1. ábra kladogramja mutatja be, amely az APGIII besorolási rendszerén alapul (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009). A két modellnövény mellett harmadik pillangósvirágúként vizsgáltuk a borsót (*P. sativum*), mely a vizsgálatunkban referencia fajként kezelt *M. truncatula* legközelebbi rokona a kiválasztott fajok közül. Bár a teljes genom szekvenálását célzó programja nem zajlott, számos genomikai eszköz már erre a fajra is rendelkezésre áll. A nagy múltra visszatekintő klasszikus genetikai vizsgálatok mellett ma már léteznek BAC könyvtárak, EST adatok és EMS-indukált mutánsbank is (TILLING) borsóra (Dalmais et al., 2008). Ezen kívül a jellemzően magas szekvencia hasonlóságot felhasználva, a modell fajokban azonosított szimbiotikus gének ortológjait általában klónozták a *P. sativum*-ból is, ezáltal a számunkra érdekes szekvenciák többsége ebből a genomból is elérhető volt az adatbázisokban. A hatalmas mezőgazdasági jelentőséggel bíró szója (*Glycine max*, Fabales) növényen szintén zajlanak a nitrogénkötő szimbiózist célzó kutatások, emellett teljes genom szekvenciája is elérhető. Azonban ez egy paleopoliploid faj, mely a közelmúltban történt részleges és nagy léptékű genom duplikációs események nyomát is magán hordozza (Schlueter et al., 2007; Schmutz et al., 2010), így génjeinek mintegy 75%-a több kópiában is jelen van a genomjában. Fontossága ellenére, homeológ génjeinek nagy száma miatt, melyek diverzifikációja már elkezdődött, úgy döntöttünk, hogy a *G. max* szekvenciákat kihagyjuk az összehasonlításunkból. A vizsgált fajok közül nitrogénkötő szimbiózist csak a pillangósvirágúak: a *M. truncatula*, a *P. sativum* és a *L. japonicus* alakít ki. Arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis kialakítására, egy kivétellel, mindegyik kiválasztott faj képes. Az elsőként megszekvenált genommal bíró zárvatermő modell növény, az *Arabidopsis thaliana* sem nitrogénkötő, sem mikorrhiza szimbiózist kialakítani nem tud.

---

**4.1. ábra.** A zárvatermő növények rendszertani fája. A 4. és 5. fejezetben tárgyalt csoportokat színes kerettel jelöltük. A keret színe megfelel az adott csoport 4.3. táblázatban használt színezésének. Fekete keret jelöli a táblázatban nem szereplő csoportokat. A "The Angiosperm Phylogeny Group" (2009) nyomán, módosítva.

---



4.1. ábra

#### 4.1.3. A kiválasztott homológ szekvenciák előzetes analízise

A *M. truncatula* szimbiotikus szekvenciák, és a szimbiotikus funkcióval nem rendelkező kontroll szekvenciák felhasználásával kiterjedt adatbázis kereséseket végeztünk 10 kiválasztott faj elérhető szekvenciái között. Célunk a *M. truncatula* kereső szekvenciákhoz leghasonlóbb találatok összegyűjtése volt. A keresések menetének leírása, illetve a szekvenciák minőségellenőrzése és esetleges javítása a 3.1. fejezetben olvasható. Minden gén, illetve géntermék esetén minden fajból csupán egy találatot választottunk ki további elemzésre: azt amelyik hosszban és aminosav szekvencia szinten leghasonlóbb az adott *M. truncatula* kereső szekvenciához. Mivel más információt (úgy mint genomi lokáció, funkció) nem használtunk ahhoz, hogy biztosan meghatározzuk az ortológ/paralóg viszonyokat, ezeket a kereső szekvencia feltételezett ortológjaiként kezeltük. A könnyebb követhetőség kedvéért mindig az adott *M. truncatula* szekvencia neve alapján adtunk nevet a kiválasztott legjobb találatnak, akkor is, ha az a szakirodalomban már más néven volt ismert, illetve az adatbázisokban más néven volt annotálva (pl. számos *L. japonicus* szekvencia esetén). A kiválasztott szekvenciák egyedi azonosítói, továbbá az általunk összerendezett, illetve prediktált cDNS és aminosav szekvenciák esetében a kódoló szekvencia predikcióhoz használt DNS szekvenciák azonosítói a 6. fejezetben, a mellékletek között elérhetőek (10.1. táblázat). Szekvenálási hiányosságok miatt egyes szekvenciák csak részlegesen voltak elérhetőek, ezeket minden említésükkor megfelelően jelöltük a dolgozatban.

Számos vizsgált gén több tagból álló géncsalád egy tagja. Azért, hogy bizonyítsuk, hogy a kapott leghasonlóbb homológ az adott *M. truncatula* szekvenciához tartozó legközelebbi rokon szekvencia, reciprok BLAST kereséseket is végeztünk úgy, hogy a kapott legjobb találatokkal kerestünk az eredeti *M. truncatula* kereső szekvenciát is hordozó adatbázisokban. Az esetek többségében a keresések legjobb találata az eredeti *M. truncatula* kereső szekvencia volt, itt nem vetettük el a géntermékek között feltételezett ortológ viszonyt. Kivételnek bizonyultak azonban az *A. thaliana*, *O. sativa* és *Z. mays* LYK3 homológok, és az *A. thaliana* NFP, DMI3 és IPD3 homológ szekvenciák. Az ezekkel végzett reciprok BLAST keresések más *M. truncatula* fehérjékhez az eredeti kereső szekvenciánál nagyobb hasonlóságot mutattak. Ezek alapján feltételezzük, hogy a fenti genomok nem hordozzák az adott *M. truncatula* gének ortológjait. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk továbbá, hogy az *A. thaliana* genom nem kódolja a DMI2 és a LIN gének ortológjait sem (Zhu et al., 2006; Kiss et al., 2009). A referencia *M. truncatula* szekvenciával nagy valószínűséggel nem ortológ leghasonlóbb találatokat az ábrákon mindenütt (csillaggal) kiemelve ábrázoltuk.

Minőségellenőrzés és javítás után a kiválasztott legjobb találatokat hosszuk alapján összevetettük a megfelelő feltételezett ortológ *M. truncatula* fehérjével. Egy ilyen összehasonlítással előzetes információt nyerhettünk azt illetően, hogy az egyes fehérjék domén összetétele mennyire jól feleltethető meg egymásnak. Amennyiben nagyobb hosszbeli különbségek tapasztalhatóak, az feltételezhető, hogy bizonyos fehérjék az ortológjaikhoz képest elveszítettek, vagy éppen szereztek más (típusú) domén(ek)e(t) evolúciójuk folyamán. Az aminosav szekvenciák hosszát a 4.2. táblázat mutatja mind a szimbiotikus (A), mind a kontroll (B) szekvenciákat illetően. A szekvenciák többsége nem mutatott kimagasló eltérést a hosszúságukban, így megfelelőnek bizonyultak a későbbi, aminosav szekvencia szinten végzett összehasonlítások elvégzéséhez. Nagyobb hosszbeli variáció (a 4.2. táblázatban színnel kiemelve), mely az adott fehérje funkcionális képességeit érintő jelentősebb változásokat feltételezhet, csupán a szimbiotikus szekvenciák között fordult elő, továbbá ezek a különbségek nem csupán nem-ortológ szekvenciákat érintettek. Több mint 20% hosszbeli eltérést mutatott a megfelelő *M. truncatula* referencia szekvenciához képest három nem-ortológ *A. thaliana* fehérje (DMI3, IPD3 és LIN), és az egyszikűek feltételezett DMI2 ortológjai. A többi nem-ortológ leghasonlóbb találat nem tűnt ki a hossz összehasonlítások során. Másfelől az egyszikű NSP2 homológok, illetve a *Z. mays* ERN1 szekvencia említésre méltó 11-15%-os eltérést mutatott a referenciákhoz képest. Érdekes módon a másik egyszikű, az *O. sativa* ERN1 szekvencia hossza közel azonos a *M. truncatula* ERN1 hosszával.

---

**4.2. táblázat.** A 4.1. fejezetben bemutatott szimbiotikus (A) és kontroll (B) fehérjék hossza. A sorok fejlécében a fehérjék neve, az oszlopokéban a növényfajok kétbetűs rövidítése olvasható. A vizsgált fajok a táblázatban balról jobbra haladva egyre távolabbi rokonságban állnak a referenciaként használt *M. truncatula*-val. A szimbiotikus fehérjék közül a cellák közepébe írva tüntettük fel a közös szimbiotikus útvonal tagjait. A táblázatokban szereplő számok az egyes fehérjék hosszát jelölik db aminosavban kifejezve. A jelentősebb hosszeltérést mutató homológok kiemelése során színkódot alkalmaztunk: zöld - 11-20%, piros - >20% eltérés a megfelelő *M. truncatula* géntermék hosszától. Csillag (\*) jelöli az adott *M. truncatula* fehérjével ismert nem ortológ viszonyban álló fehérjét. Dőltbetűs szürke felirat jelzi a szekvenálási hiányosságok miatt csak részlegesen elérhető szekvenciákat. Ezeket kihagytuk a fehérjehossz összehasonlításból. Az egyáltalán nem elérhető szekvenciákat „na” felirat jelzi.

---



# A

szimbiotikus	Mt	Ps	Lj	Cs	Pt	Cp	At	Vv	Sl	Os	Zm
LYK3	620	617	621	617	614	624	617*	624	626	624*	617*
NFP	595	594	595	604	601	611	612*	590	617	624	606
DMI1	882	894	917	883	949	879	824	922	930	943	955
DMI2	925	924	923	948	933	727	929*	939	903	576	579
DMI3	523	527	518	517	521	506	646*	520	516	516	528
IPD3	513	513	518	516	524	443	264*	548	545	506	505
NSP1	554	na	542	555	556	514	510	545	542	523	523
NSP2	508	503	499	478	503	489	483	490	487	575	564
ERN1	268	248	269	241	270	280	253	260	291	266	308
NIN	933	921	878	942	925	949	974	947	912	942	902
CRE1	1003	992	993	1004	1006	989	998	1002	993	1005	995
LIN	1488	na	1485	1426	1499	1493	1115*	1494	1470	1392	1398
SUNN	974	976	986	973	973	984	980	984	986	994	996
KLV	1112	na	1137	1143	1143	1147	1151	1139	1125	1070	1064
RIT	1383	389	1383	1387	1388	1398	1396	1386	1385	1357	1361
PIR1	1283	57	1277	1284	1308	1293	1282	1301	1289	1287	1306

# B

kontroll	Mt	Ps	Lj	Cs	Pt	Cp	At	Vv	Sl	Os	Zm
RBCL	475	475	475	475	475	475	479	475	477	477	476
ATPB	490	491	498	498	498	498	498	498	498	498	498
MATK	506	506	508	504	510	506	504	502	509	511	513
G6PDH	515	517	517	517	514	407	515	516	511	517	517
MAG1	190	153	186	188	191	190	190	190	189	188	188
AGT1	401	401	401	401	401	401	401	401	401	402	403
DH	243	na	240	241	243	240	239	243	242	243	244
EIF3K	235	83	229	231	235	237	226	229	234	226	226
ATPQ	177	168	168	168	168	168	168	168	168	169	170
TAFII15	139	na	135	136	144	136	134	136	138	140	137
ATP7	244	na	242	240	240	240	240	240	240	240	243
RRMP	213	48	210	212	217	214	222	214	217	214	215

#### 4.1.4. Az aminosav szekvencia illesztések összehasonlító elemzése

Az evolúció folyamán egyes fehérjék nem csupán nagy domén átrendeződések, új domének megszerzése vagy egyesek elvesztése révén tehetnek szert új funkcionális képességekre, vagy végezhetnek eredményesebben egy feladatot, amit már korábban is képesek voltak ellátni, csak gyenge hatékonysággal. Egy-egy megfelelő pozícióban történt aminosav csere is képes lehet befolyásolni a fehérjék működését. A hasonlóságok és különbségek bemutatására páronkénti illesztéseket végeztünk minden fajból, minden egyes kiválasztott fehérje és *M. truncatula* homológja között. A kapott százalékos azonossági (ID) és hasonlósági (*SIM*) értékeket a 4.3. táblázat mutatja be a szimbiotikus (A) és a kontroll (B) szekvenciákat illetően is. A szekvenciákban tapasztalható változások nyomon követésének megkönnyítésére szinkódoltuk az eltérések nagyságát jelző számokat.

A vizsgált fajok a *M. truncatula*-hoz viszonyított rendszertani viszonyuk alapján sorba rendezve láthatóak a 4.3. táblázatban, minél távolabbi rokon egy adott faj, annál messzebb helyezkedik el a referenciától. Legközelebbi rokonai a nitrogénkötő gümő kialakítására képes pillangósvirágúak (Fabales), majd egyéb kétszikűek (Dicotidae) következnek, egyre nagyobb rendszertani ugrásokkal (lásd 4.1. ábra). A legnagyobb rendszertani ugrás után következnek az egyszikűek (Liliopsida), ezek a *M. truncatula* legtávolabbi rokonai ebben a vizsgálatban. Várhatóan tehát a 4.3. táblázatban balról jobbra haladva az egyes géntermékek ID és *SIM* értékeinek csökkenie, vagyis a szekvencia variancia mértékének növekednie kell a *M. truncatula*-tól számított rendszertani távolság növekedésével párhuzamosan. Ez a változás lehet egyenletes, de lehetnek adott növénycsoportok között jelentősebb ugrások az értékek változásában, melyek adott esetben a géntermékek működését formáló evolúciós erők hatását jelezhetik. Ezen táblázat értékeinek elemzése történhet soronként - vagyis az egyes gének fejlődésének szemszögéből, vagy oszloponként – az egy-egy fajban megtalálható homológ génkészlet jellemzőinek összevetésével.

Ez utóbbi esetben, tehát a táblázat értékeit fajonként értékelve, azonnal szembetűnik az egyik szimbiotikus együttélés kialakítására sem képes *A. thaliana*. A szekvenciák előzetes analízise (lásd 4.1.3. fejezet) során több *M. truncatula* szimbiotikus génről bebizonyosodott, hogy nem létezik ortológja az *A. thaliana* genomban. A szekvenciák páronkénti illesztéséből származó ID és *SIM* értékek pedig mind rendre alacsonyabbak az ugyancsak keresztesvirágú (Brassicales), de mikorrhiza szimbiózis kialakítására képes *C. papaya* géntermékek értékeihez képest. Sőt, számos esetben a pillangósvirágúaktól rendszertanilag jóval távolabb eső (lásd 4.1

ábra) *S. lycopersicum* szekvenciák is magasabb értékeket mutattak, mint az *A. thaliana* találatok (a reciprok BLAST keresésekben nem-ortológus bizonyult találatok mellett: DMI1, NSP1, NSP2, ERN1, KLV, RIT).

Ha a sorok értékeit nézzük a 4.3. táblázatban, vagyis egy-egy gén evolúciós változásait követjük nyomon, a színek alapján könnyen látható, hogy a *M. truncatula*-hoz viszonyított rendszertani távolság növekedésével az ID és *SIM* értékek valóban csökkennek, azonban az is nyilvánvaló, hogy a különböző gének homológjai más-más skálán mérhetők. Egyesek nagyobb léptékben csökkenő értékeket mutatnak, mások lassabban változnak. A különböző gének eltérő sebességgel fejlődtek, és különbözőképpen konzerválódtak a zárva termő növények törzsfejlődése folyamán. Az ID és *SIM* értékek jól korrelálnak az egyes géntermékek esetén, így a további összehasonlításokban elég volt csupán az egyik értéket vizsgálnunk. Mi a kevésbé megengedő paramétert, az ID értékeket (a páronkénti illesztésekben az egyes illesztési pozíciókban azonos aminosavak százalékos arányát) vetettük össze a különböző gének evolúciós fejlődésének jellemzéséhez, a hasonló mértékű/sebességű változásokat mutató gének összerendezéséhez.

---

**4.3. táblázat.** A *M. truncatula* szimbiotikus (A) és kontroll (B) szekvenciák és leghasonlóbb homológjuk közötti hasonlóság alakulása. Legfelül látható az összehasonlításba bevont fajok rendszertani besorolása, melyek a táblázatban balról jobbra haladva egyre távolabbi rokonságban állnak a referenciaként használt *M. truncatula*-val. A táblázatok fejlécén, a vizsgált fajokat magába foglaló kládokat színekkel különböztettük meg, a 4.1 ábra jelöléseivel megegyező módon. Az A rész fejlécében az egyes fajok nitrogénkötő gyökérgümő, illetve arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis kialakítására való képességét is mutatjuk (+/-). A táblázatok kezdő oszlopában, a sorok fejlécében a fehérjék neve olvasható. A szimbiotikus fehérjék közül a cellák közepébe írva tüntettük fel a közös szimbiotikus útvonal tagjait. A táblázatokban látható értékek a *M. truncatula* és az adott homológ fehérje páronkénti illesztéséből származó százalékos hasonlósági (*SIM*) és azonossági (ID) értékek. Csillag (\*) jelöli az adott *M. truncatula* fehérjével ismerten nem ortológ viszonyban álló fehérjéket. Zárójelben mutatjuk a szekvenálási hiányosságok miatt csak részlegesen elérhető szekvenciák értékeit. Az egyáltalán nem elérhető szekvenciákat „na” felírat jelzi. Az ID értékek változását a mezők háttérének színezésével érzékeltetjük: ID > 85% - piros, ID: 85-75% - narancssárga, ID: 74-65% - világos narancssárga, ID: 64-55% - citromsárga, ID: 54-45% - világos zöld, ID: 44-35% - türkizkék (aqua), 35% > ID - szürke.

---

A

DICOTIDAE												LILIOPSIDA
ROSIDAE												COMMELINIDAE
EUROSIDAE I						EUROSIDAE II			ASTERIDAE			
Fabales	klád	Fabales	Fabales	Cucurbitales	Malpighiales	Brassicales	Brassicales	Vitales	Solanales	Poales	Poales	
<i>Medicago truncatula</i>	szimb. fehérrék	<i>Pisum sativum</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Carica papaya</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Zea mays</i>	
gyökérgümő mikorrhíza	szimbiózis	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
LYK3	ID	84	78	61	62	63	56*	62	59	54*	54*	
	SIM	90	87	76	76	78	72*	76	75	71*	69*	
NFP	ID	86	72	49	52	53	28*	56	50	40	42	
	SIM	93	84	69	70	70	52*	73	69	61	62	
DMI1	ID	92	84	70	72	(73)	70	72	71	68	69	
	SIM	95	88	81	81	(83)	83	83	84	80	81	
DMI2	ID	89	82	56	61	(63)	32*	60	55	56	55	
	SIM	93	88	72	75	(77)	51*	74	71	70	71	
DMI3	ID	(93)	87	79	81	78	34*	80	72	71	70	
	SIM	(96)	94	88	90	88	56*	90	83	84	82	
IPD3	ID	90	79	58	59	(56)	16*	60	52	46	45	
	SIM	96	89	76	76	(72)	32*	76	70	63	61	
NSP1	ID	na	82	61	67	62	54	67	58	45	43	
	SIM	na	89	75	79	76	71	82	73	60	60	
NSP2	ID	91	75	60	67	65	52	69	62	52	52	
	SIM	95	85	76	80	79	67	81	77	66	66	
ERN1	ID	(87)	77	61	66	62	46	67	53	42	47	
	SIM	(91)	85	75	79	75	60	79	70	56	62	
NIN	ID	86	63	39	45	48	43	48	42	37	35	
	SIM	91	75	56	62	64	60	64	58	56	54	
CRE1	ID	93	85	76	76	77	72	78	69	58	58	
	SIM	95	91	86	87	87	82	88	82	74	75	
LIN	ID	na	83	61	64	62	23*	65	59	33	34	
	SIM	na	90	77	79	76	48*	78	75	55	55	
SUNN	ID	86	80	61	64	62	61	62	61	53	53	
	SIM	91	89	76	78	77	76	77	75	70	68	
KLV	ID	na	72	66	67	66	64	67	66	57	55	
	SIM	na	83	78	80	79	77	81	79	74	73	
RIT	ID	(92)	93	79	82	81	77	82	78	70	68	
	SIM	(95)	97	90	92	91	88	92	89	84	83	
PIR1	ID	(98)	95	85	87	86	84	86	84	74	72	
	SIM	(98)	98	92	93	93	92	94	92	86	85	

B

Fabales	klád	Fabales	Fabales	Cucurbitales	Malpighiales	Brassicales	Brassicales	Vitales	Solanales	Poales	Poales	
<i>Medicago truncatula</i>	kontroll fehérrék	<i>Pisum sativum</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Carica papaya</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Zea mays</i>	
RBCL	ID	95	97	96	96	96	94	96	93	93	93	
	SIM	98	99	99	99	99	97	99	97	97	97	
ATPB	ID	95	96	95	95	94	94	95	94	92	91	
	SIM	98	97	97	98	97	97	98	97	96	96	
MATK	ID	90	82	69	63	66	63	70	66	57	56	
	SIM	95	88	79	74	77	74	79	76	72	70	
G6PDH	ID	93	88	83	83	(84)	83	83	81	76	74	
	SIM	96	94	92	92	(93)	94	93	92	87	86	
MAG1	ID	(99)	95	92	92	91	86	91	92	92	92	
	SIM	(99)	99	98	97	97	92	96	97	97	97	
AGT1	ID	96	90	88	88	90	86	84	86	87	83	
	SIM	98	96	96	94	96	95	94	96	94	92	
DH	ID	na	83	81	86	84	83	82	78	76	77	
	SIM	na	90	91	92	92	90	91	87	89	87	
EIF3K	ID	(90)	88	79	82	83	75	83	77	76	77	
	SIM	(98)	93	91	90	90	89	90	87	88	87	
ATPQ	ID	86	85	84	82	84	82	83	84	78	74	
	SIM	91	95	93	90	94	92	91	94	92	89	
TAFII15	ID	na	92	79	79	82	80	84	79	65	67	
	SIM	na	98	93	89	93	92	95	93	85	87	
ATP7	ID	na	82	73	70	71	69	78	70	65	64	
	SIM	na	92	87	86	84	85	90	85	82	79	
RRMP	ID	(90)	87	69	71	66	61	68	68	61	58	
	SIM	(96)	88	88	86	83	81	82	84	80	78	

ID>85% 85-75% 74-65% 64-55% 54-45% 44-35% 35%>ID

4.3. táblázat

#### 4.1.5. Az aminosav szekvenciák változása alapján felállított evolúciós kategóriák

A gének evolúciós változási sebességének vizsgálatához a 4.3. táblázatban szereplő fajokat rendszertani helyzetük és szimbiotikus képességeik alapján három csoportra oszthatjuk. Ezek: a nitrogénkötő szimbiózis kialakítására képes kétszikű fajok, a nem gümöző kétszikű fajok, és az egyszikűek fajcsoportja. A homológ szekvenciák ID értékeit génenként/géntermékenként követve a vizsgált fajokon át, az értékek alakulásában a legjelentősebb változást jellemzően ezen csoportok határán tapasztaljuk. Egyszer a gümöző és nem gümöző, majd a kétszikű és egyszikű fajok között. Ezek a változások eltérő mintázatot mutatnak a különböző géntermékek esetében, ezek nyomon követéséhez a 4.3 táblázatból származó ID értékeket a 4.4 ábrán, grafikonokon ábrázoltuk. Az előző bekezdésben leírtak alapján tudtuk, hogy a kereső szekvenciával számos nem-ortológ leghasonlóbb találatot adó *A. thaliana* növényre szimbiotikus képességének elvesztése révén eltérő evolúciós erők hathattak, így ezek értékeit nem jelentettük meg a grafikonokon. A könnyebb követhetőség érdekében a homológ szekvenciák értékeit szaggatott vonallal kötöttük össze.

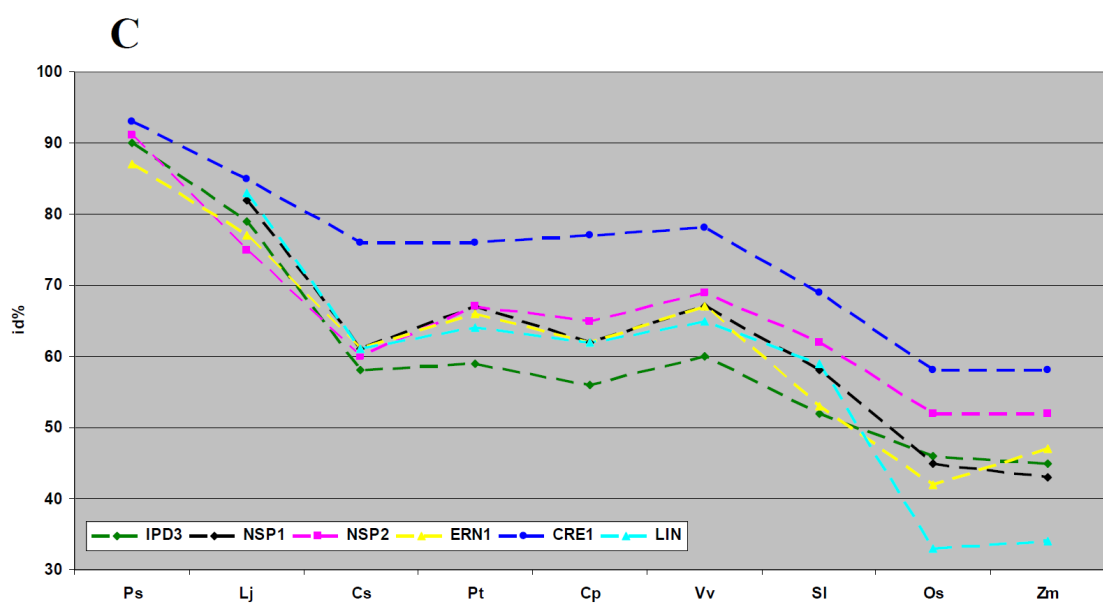
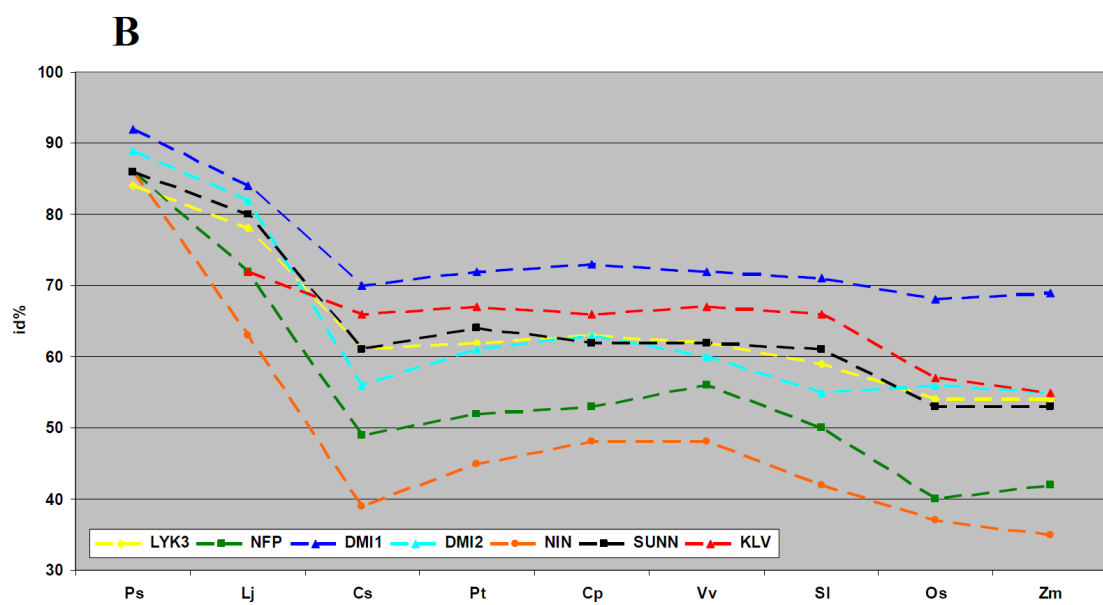
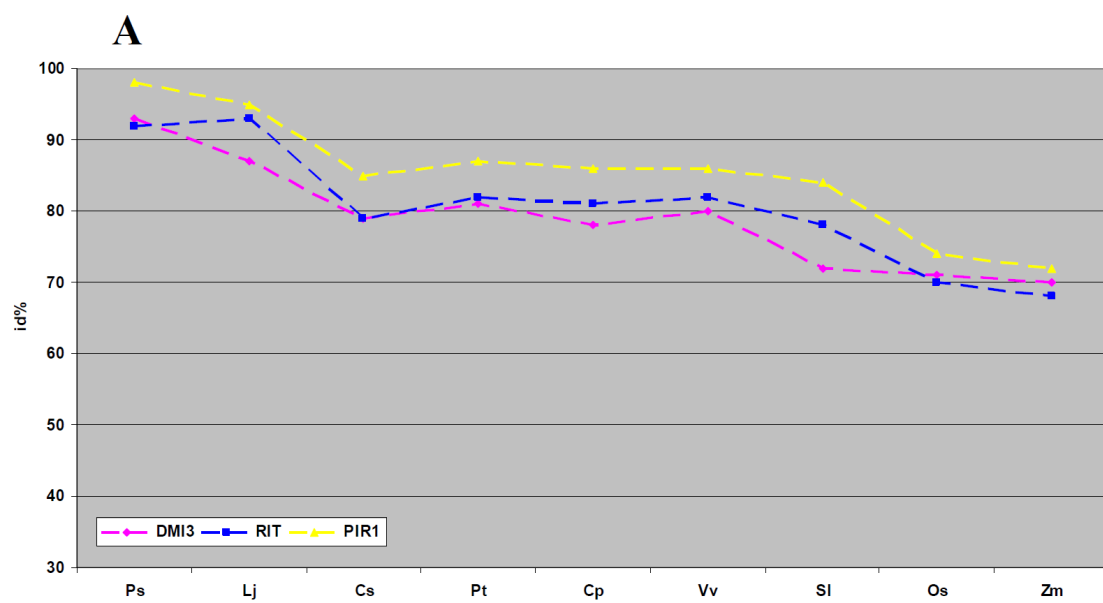
A görbék lefutása, és a fajcsoportok határán tapasztalt ID érték változások egymáshoz viszonyított aránya alapján három-három kategóriát állítottunk fel a szimbiotikus (**A**, **B**, **C**) és a kontroll (**A'**, **B'**, **C'**) fehérjéknél. A kategóriákba soroláshoz elsősorban azt vettük figyelembe, hogy az egyes homológ szekvenciák ID értékei a fajcsoportok között mekkora ugrást mutattak, vagyis mekkora változás állt be a csoport fehérjéinek összetételében. Az **A** kategóriába olyan szimbiotikus géntermékeket soroltunk, melyek a legkisebb változásokat mutatták. Ezekre az jellemző, hogy a pillangósok és egyéb kétszikűek közti azonosság lecsökken kb. 80%-ra, míg az egyszikűeknél egy további mintegy 10%-os esés eredményeként ezek a fehérjék már csak kb. 70%-os hasonlóságot mutatnak a megfelelő *M. truncatula* szimbiotikus génekkel. Vagyis a törzsfán egymást követő fajcsoportok között mindkét esetben viszonylag alacsony mértékű az ID értékek változása. Bár az ezen kategóriába eső gének mutatják a legnagyobb fokú konzerváltságot, észrevehetjük azt is, hogy valamivel nagyobb az értékek változása a pillangósok és egyéb kétszikűek között mint a kétszikűek és egyszikűek csoportja között. A **B** kategóriába sorolt szimbiotikus géntermékek legszembetűnőbb közös jellemzője, hogy drasztikus változás (kb. 70-40%-ra esés) mutatható ki a pillangósvirágú fehérjék és az egyéb kétszikűek között, míg a további evolúciós eltávolodás már nem mutat szembetűnő változást a vizsgált fehérjék között - kivéve azt a kb. max. 10%-os esést a kétszikűek és egyszikűek határán, mely arányaiban megegyezik az **A** kategóriában tapasztalt értékkel. A **C** kategóriába azok a géntermékek

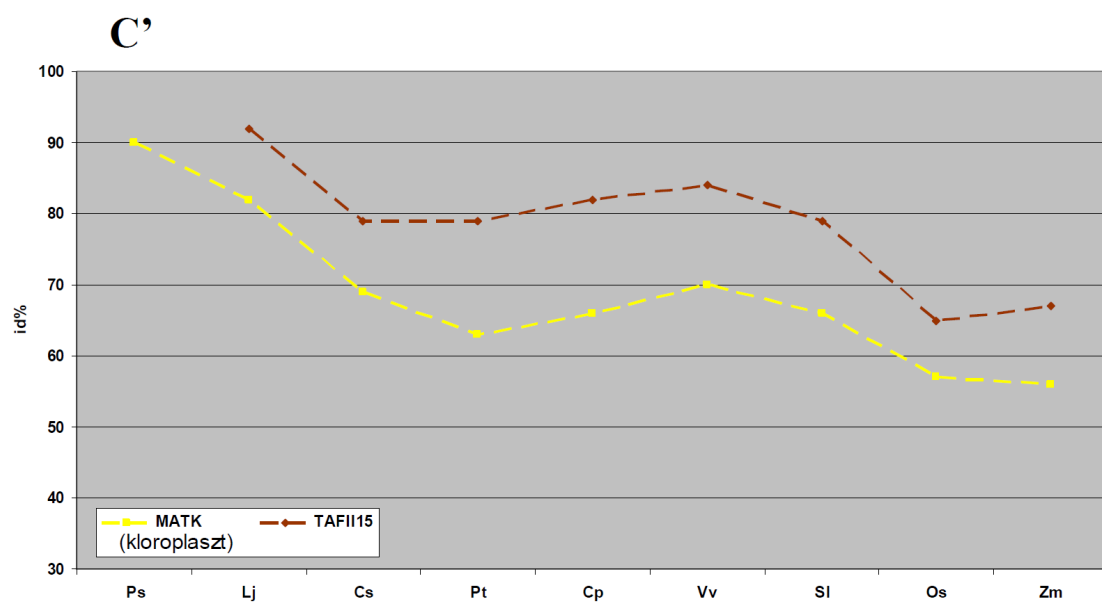
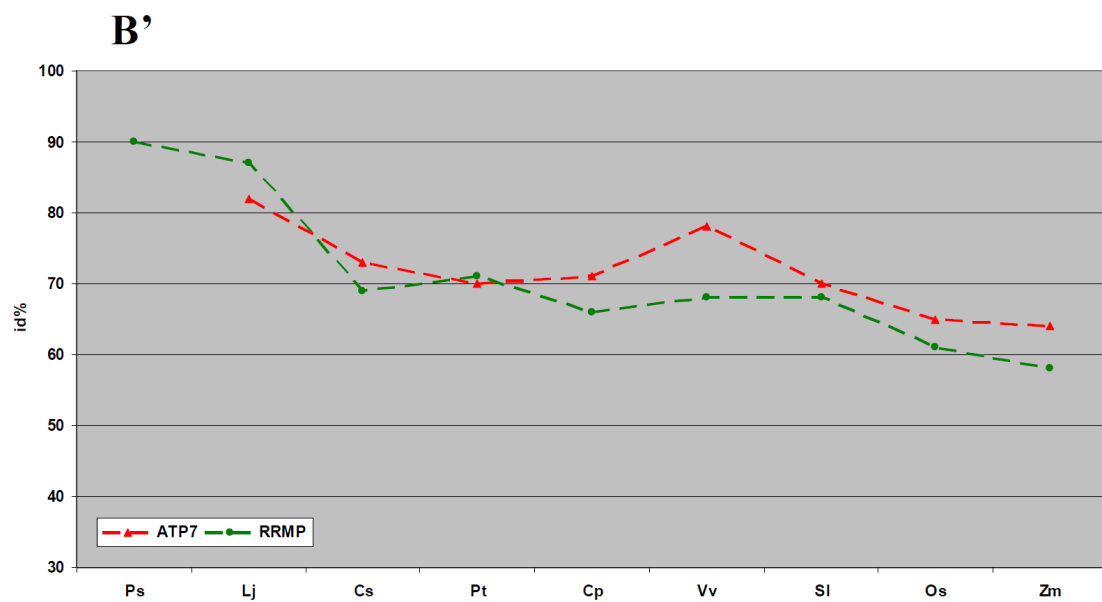
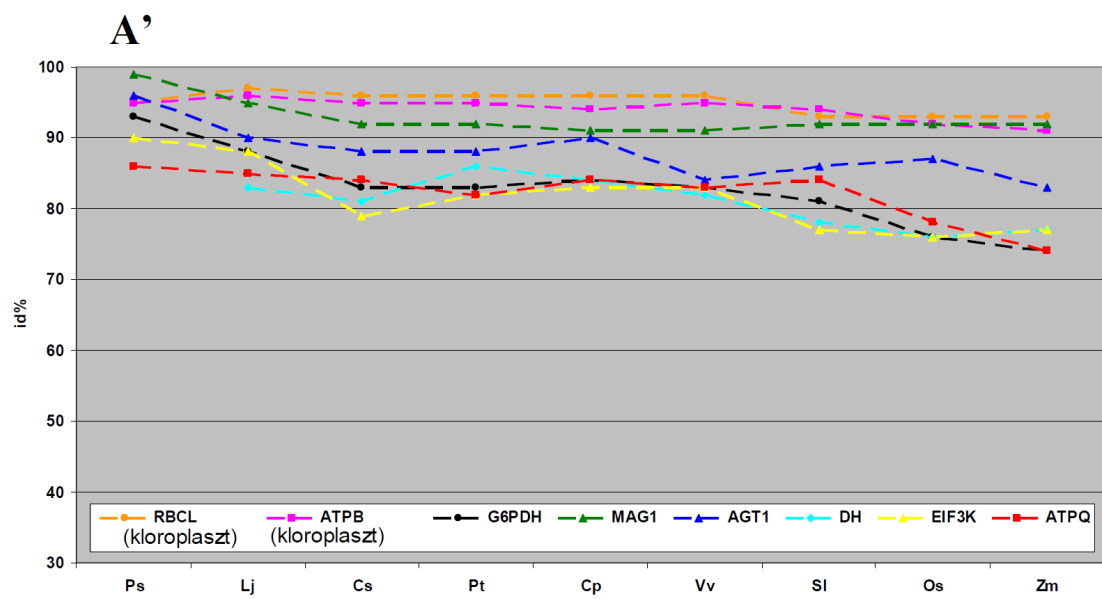
kerültek, amelyek a kétszikűek és egyszikű fajcsoportok között a legnagyobb változást (kb. 15-60%-os esést) jelző értékeket mutatták, és hasonló esést mutattak a nitrogénkötő szimbiózisra képes és arra képtelen kétszikűek között, mely értékek jellemzően az **A** és **B** kategóriák megfelelő értékei közé estek. Néhány fehérje besorolása esetén, ahol a kétszikű fajcsoportok között tapasztalt átmenet hasonló volt (DMI1 és KLV – **B** kategória, illetve CRE – **C** kategória) és kevésbé drasztikus mint a többi **B** kategóriába sorolt fehérjénél, a kétszikűek és egyszikűek határán tapasztalható változás nagysága alapján döntöttük el a besorolásukat. A kontroll csoportnál törekedtünk arra, hogy ha lehet, hasonló jellemzőkkel bíró kategóriákat állítsunk fel. Ezek alapján állt össze a legkisebb változásokat mutató fehérjéket tartalmazó **A'** kategória, ahol azonban az A-hoz képest is kisebb eltérések voltak, hiszen a legtávolabbi rokon fehérjék azonossági értéke is 80% közelébe esett. A **B'** kategóriába eső fehérjéket a pillangósvirágúak és egyéb kétszikűek közti drasztikusabb változás (kb. 70%-ra esés), és a másik két fajcsoport, a kétszikűek és egyszikűek közti kisebb változás jellemzi. Ugyanakkor a **C** kategóriához leginkább hasonló **C'** kategóriába már csak két géntermék került, mely a **C**-hez hasonló két-eséses változási modellt mutatta. A géntermékek kategorizálása során az egymásnak nagyjából megfeleltethető szimbiotikus és kontroll szekvencia kategóriák (**A-A'**, **B-B'**, **C-C'**) közül valamennyibe kerültek géntermékek, de nem azonos eloszlásban. A kontroll szekvenciák zöme, nyolc géntermék a konzervált szekvenciákat hordozó **A'** kategóriába volt sorolható, míg a szimbiotikus szekvenciák közül csupán három került az **A** kategóriába. A **B** és **C** kategóriákba azonban 7 és 6 géntermék került, szemben a **B'** és **C'** 2-2 tagjával. Feltételezhető, hogy az egyes géntermék kategóriák tagjainak evolúcióját különböző erők hajtották. Ennek tárgyalása az 5.1. fejezetben olvasható.

---

**4.4. ábra.** A homológok konzerváltsága alapján felállított szimbiotikus (A, B, C) és az azoknak megfelelő kontroll (A', B', C') fehérje kategóriák. Az x tengely a vizsgálatba bevont fajokat, az y tengely az adott *M. truncatula* fehérje és homológjának páronkénti illesztéséből származó százalékos azonossági értékeket (a 4.3. táblázatban ID) mutatja. A könnyebb követhetőség érdekében az adott *M. truncatula* fehérjéhez tartozó összes értéket szaggatott vonal köti össze. A géntermékek neve, és jelölésük a grafikonok bal alsó sarkában látható jelmagyarázatban olvasható: A: DMI3 (rózsaszín rombusz), RIT (kék négyzet), PIR1 (citromsárga háromszög); B: LYK3 (citromsárga rombusz), NFP (zöld négyzet), DMI1 (kék háromszög), DMI2 (türkizkék háromszög), NIN (narancssárga csillag), SUNN (fekete négyzet), KLV (piros háromszög); C: IPD3 (zöld rombusz), NSP1 (fekete rombusz), NSP2 (rózsaszín négyzet), ERN1 (citromsárga háromszög), CRE1 (kék csillag), LIN (türkizkék háromszög); A': RBCL (narancssárga csillag), ATPB (pink négyzet), G6PDH (fekete csillag), MAG1 (zöld háromszög), AGT1 (kék háromszög), DH (türkizkék rombusz), EIF3K (citromsárga háromszög), ATPQ (piros négyzet); B': ATP7 (piros háromszög), RRMP (zöld csillag); C': MATK (citromsárga négyzet), TAFII15 (barna rombusz). A kloroplaszt genomban kódolt szekvenciákat felirattal külön jelöltük, a többi sejtmagi kódolású.

---

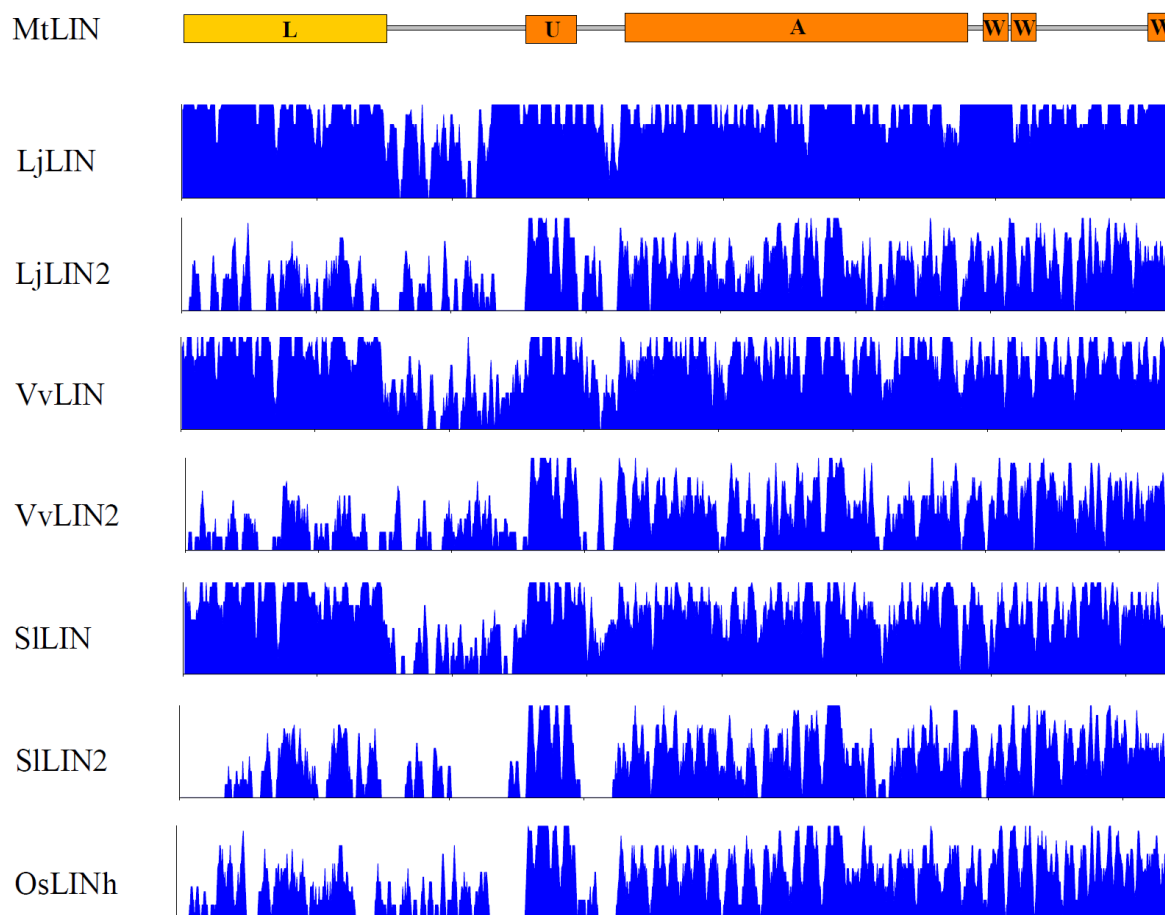






## 4.2. A *LIN* géncsalád evolúciós vizsgálata

Az előző fejezetben ismertetett analízisbe bevont szimbiotikus gének egyike a csoportunk által azonosított *LIN* (Kiss et al., 2009). A gén által kódolt fehérje funkciójának feltárása jelenleg is folyik. Ennek egyik elemeként célunk volt a lehetséges homológ gének minél teljesebb körű felkutatása és jellemzése. A *M. truncatula* *LIN* fehérje aminosav szekvenciájával végzett adatbázis keresések eredményeként nem csupán a 4.2. és 4.3. táblázatokban bemutatott homológokat találtuk meg, hanem pl. alacsonyabbrendű harasztokban is kaptunk találatot. Ezen kívül több növényben egy másik, kisebb hasonlósággal bíró szekvenciát is azonosítottunk. Ezek doménösszetételét és szekvenciáját összehasonlítva megállapítottuk, hogy a *LIN* génen kívül egy hozzá rendkívül hasonló másik gén is jelen van számos növény genomjában, a pillangósvirágú *L. japonicus* növényen kívül például a szőlőben (*V. vinifera*) és a paradicsomban (*S. lycopersicum*) is (4.5. ábra). A *LIN* géncsaládnak ezt a második tagját *LIN2*-nek neveztük el. A 4.5. ábrán is kitűnik, hogy a *LIN2* fehérjék elsősorban az aminosavlánc N-terminális végén, vagyis a korábban leírt *LIN* szekvencián *LIN* doménnek elnevezett szakaszon (Kiss et al., 2009) mutatnak számottevő eltérést.

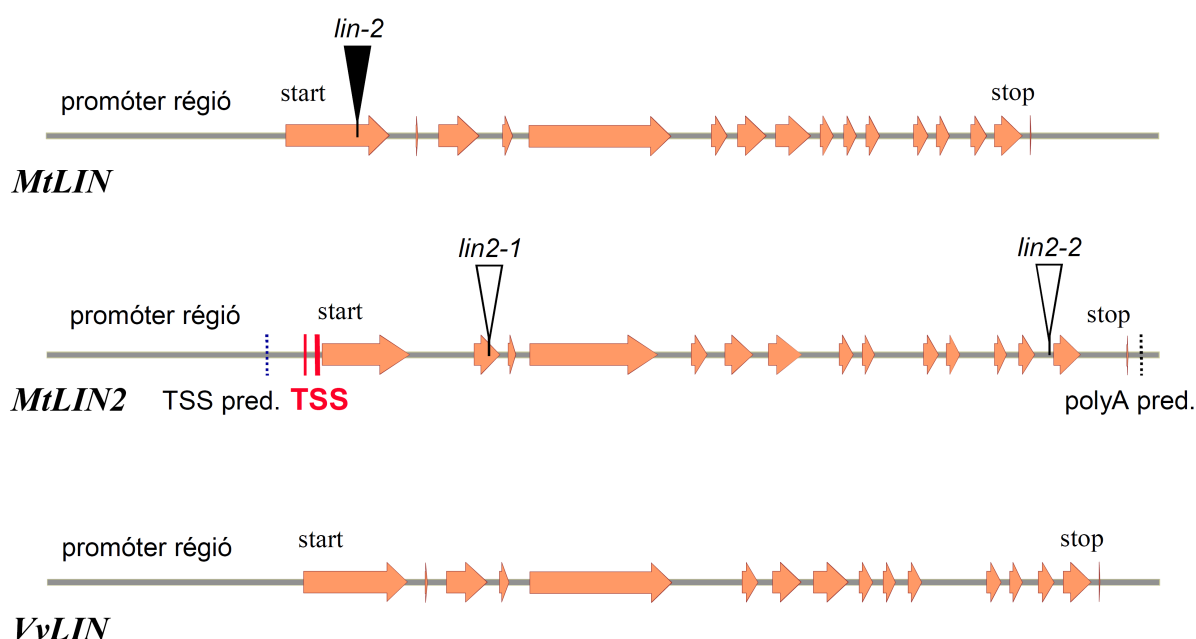


4.5. ábra

**4.5. ábra.** LIN és LIN2 homológ aminosav szekvenciák a növényvilágban. Az ábra tetején a *M. truncatula* LIN fehérje domén felépítése látható: a prediktált U-box (U), Armadillo (A) és WD40 (W) doméneket narancs téglalapok jelölik, citromsárga színnel a LIN domént (L) jelöltük. A grafikonok a *M. truncatula* LIN és az adott homológ aminosav szekvencia páronkénti illesztésének grafikus megjelenítései. A blosum62mt2 aminosav szubsztitúciós mátrix alapján az egyes illesztési pozíciókra számolt, 0 és 1 közé eső származtatott értékeket kék oszlopok jelzik, ezek az illesztés adott pozíciójában mért hasonlósági értékkel arányosak. Az ábra a VectorNTI (Invitrogen) programcsomag AlignX programjának felhasználásával készült.

#### 4.2.1. LIN homológ génszekvenciák gyűjtése és meghatározása

A szekvencia adatbázisokban elérhető összerendezett, teljes LIN és LIN2 szekvenciákat összegyűjtöttük, minőségüket ellenőriztük. Ezek mellett részleges találatokat is kaptunk, ahol az adott homológ genomi szakasz szekvenálása csak részlegesen volt elérhető, vagy a találat egy-egy EST szekvencia volt csupán. Ilyenek voltak a *M. truncatula* LIN2 és az *Adiantum capillus-veneris* páfrány LIN homológ szekvenciái, melyeket kísérletesen kiegészítettünk. Emellett az adatbázisokban teljes hosszúságban elérhető *V. vinifera* LIN szekvenciát is klónoztuk funkcionális vizsgálatok céljára.



**4.6. ábra.** A *M. truncatula* LIN, LIN2 és a *V. vinifera* LIN gének exon-intron szerkezete. A promóter régiótól 3' irányban, a start és stop kodonok között nyilak jelölik a gének transzlálódó/átíródo exonjait. Kék és fekete szaggatott vonal jelzi az *in silico* prediktált LIN2 transzkripciós start (TSS pred.) és poliadenilációs (polyA pred.) helyeket. Piros telt vonalak mutatják (TSS) a kísérletesen meghatározott transzkripciós start helyeket. Fekete kitöltésű háromszög jelöli a C > T nonszensz mutáció helyét a *lin-2* mutáns vonal LIN szekvenciájában. Fehér kitöltésű háromszögek jelölik a *Tnt1* retrotranszpozon inszerció helyét a *lin2-1* és *lin2-2* mutáns vonal LIN2 szekvenciájában.

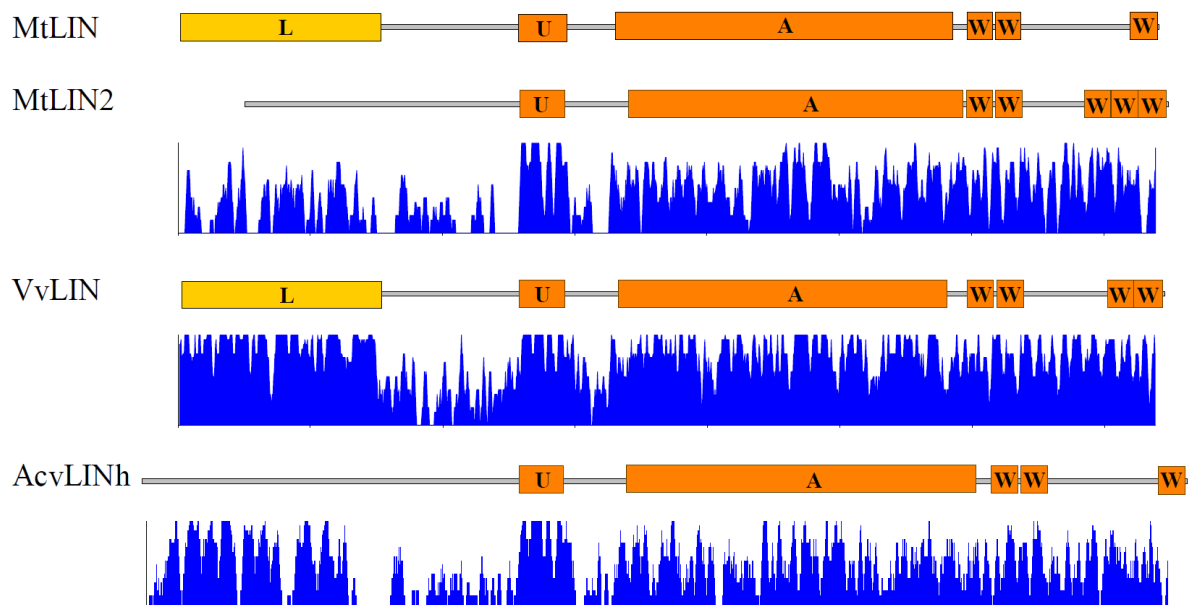
#### 4.2.1.1. A *Vitis vinifera* LIN szekvenciájának meghatározása

Nitrogénkötő gyökérgümő kialakítására csupán a Fagales, Fabales, Cucurbitales és Rosales kládok bizonyos fajai képesek. Ezek a kládok mind besorolhatóak a Rosidae magasabb rendszertani egységébe, amely csoportnak a növények törzsfejlődése folyamán legkorábban elkülönült fejlődési vonala a Vitales klád (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009) (4.1. ábra). Ily módon a gümöző növények egy nitrogénkötő gümő kialakítására nem képes, távoli, de még a Rosidae csoportba sorolt rokona a Vitales klád egyik faja, a *V. vinifera*, szőlő. A szőlő genom szekvenálási programja befejeződött (Jaillon et al., 2007), emellett egy termesztett fajta (a Pinot Noir) szekvenálása is véget ért (Velasco et al., 2007). Az összerendezett genomi szekvenciákon automatikus génpredikciók is elérhetőek. Ezek között LIN homológ után kutatva a legjobb találat az AM465615 genomi szekvencián prediktált CAN74785 azonosító számú aminosav szekvencia. A prediktált kódoló szekvenciát több EST támogatja, tehát egy kifejeződő génről van szó. Tekintve, hogy mindkét szekvenált szőlő genom Pinot Noir volt, *V. vinifera* Pinot Noir növényeket neveltünk, ezek gyökeréből izoláltunk RNS-t, majd azon reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő. A gyökér cDNS-t templátként használva amplifikáltuk, és klónoztuk a *V. vinifera* LIN gén kódoló szekvenciáját. Szekvenálással megállapítottuk, hogy a prediktált GenBank szekvencia helyes, a prediktált exon-intron határokat így kísérletesen igazoltuk. A gén exon-intron felépítését a 4.6. ábra mutatja. A 4485 bp kódoló szekvencia 16 exonon terül el egy 7183 bp-os genomi szakaszon. A *M. truncatula* LIN génnel összevetve az exonok száma azonos, hosszuk néhány bázispár eltérést mutat csak. A *V. vinifera* LIN fehérje 1494 aminosav hosszú, InterPro doménkereséssel egy U-box, egy Armadillo és négy WD40 domént prediktálhatunk, emellett hordozza a LIN domént. A *V. vinifera* LIN erős hasonlóságot mutat a *M. truncatula* LIN szekvenciával a fehérjék teljes hosszán (4.7. ábra).

#### 4.2.1.2. Az *Adiantum capillus-veneris* páfrány LIN homológ szekvenciájának meghatározása

Szekvencia adatbázisokban távoli LIN homológ után kutatva fedeztük fel a DK959426 GenBank azonosító számú EST szekvenciát, ami a *M. truncatula* LIN fehérje N-terminálisával tblastn összehasonlításban hasonlóságot mutatott. Az EST szekvencia a TST39A01NGRL0004\_K13 jelű *A. capillus-veneris* páfrány cDNS klónról származott. A klónt kutatási célra megkaptuk az azt közlő japán csoporttól (Yamauchi et al., 2005). Primer sétával meghatároztuk a cDNS inszert teljes szekvenciáját (5158 bp), ami egy potenciálisan 4659 bp-os

kódoló szekvenciát hordozott. A kódolt 1552 aminosav hosszú fehérje a fajok közötti nagy rendszertani távolság ellenére páronkénti illesztés után 40%-ban azonos, illetve 61%-ban hasonló a *M. truncatula* LIN szekvenciához. InterPro predikció alapján az *A. capillus-veneris* LIN homológ egy U-box, egy Armadillo és WD-40 doméneket hordoz, továbbá a LIN domén is felismerhető a fehérje N-terminálisán. Eredményeink alapján az *A. capillus-veneris* LIN homológ egy, a doménfelépítésében a *M. truncatula* LIN-hez igen hasonló, feltehetően E3 ubikvitin ligáz fehérje (4.7. ábra).



**4.7. ábra.** A *M. truncatula* LIN és LIN2, a *V. vinifera* LIN, illetve az *A. capillus-veneris* LIN homológ fehérje összehasonlítása. A fehérje domének jelölése megfelel a 4.5. ábra jelöléseinek. A grafikonok a *M. truncatula* LIN és az adott homológ aminosav szekvencia páronkénti illesztésének grafikus megjelenítései. A blosum62mt2 aminosav szubsztitúciós mátrix alapján az egyes illesztési pozíciókra számolt, 0 és 1 közé eső származtatott értékeket kék oszlopok jelzik, ezek az illesztés adott pozíciójában mért hasonlósági értékkel arányosak. Az ábra a VectorNTI (Invitrogen) programcsomag AlignX programjának felhasználásával készült. A fehérjék grafikus illesztését az U-box doménjükhöz igazítottuk.

#### 4.2.1.3. A *Medicago truncatula* LIN2 szekvenciájának meghatározása

Munkánk kezdetén a *M. truncatula* genomszekvenálása még folyamatban volt, a *LIN2* gén szekvenciája csak részlegesen volt elérhető. A mth2-176c14-es számú BAC klón 18, sorba nem rendezett darabból álló szekvenciáján egy 5883 bp hosszú kontig hordozta a gén nagy részét. Egyéb, előrehaladottabb fázisban járó genomszekvenálási programmal rendelkező fajok (pl. *P. trichocarpa*, *V. vinifera*) ortológ genomi régiókra eső elérhető génpredikciói, továbbá a *L.*

*japonicus* genom ortológ régióján általunk végzett *in silico* génpredikció alapján a rendelkezésre álló *M. truncatula* szekvenciáról az első exon részlegesen, az utolsó, rövid exon teljesen hiányzott. A BAC szubkontig kiterjesztésére *M. truncatula* genomi DNS-ből inverz PCR könyvtárakat készítettünk több kiválasztott restriktációs endonukleáz felhasználásával. A könyvtárak segítségével a gén 5'- és 3'- végének szekvenciáját is sikerült meghosszabbítani annyira, hogy további 1-1 BAC klón szekvencia szubkontigot kapcsolhattunk a kezdeti 5883 bp-os szakaszhoz. Az így rendelkezésünkre álló mintegy 18 Kb-nyi szekvencia információ már elegendő volt a gén kódoló szekvenciájának és promóter régiójának vizsgálatára is. (Az általunk nyert szekvencia adatok később megerősítést nyertek a *M. truncatula* genomszekvenálási program előrehaladtával.)

A gén kódoló szekvenciájának megerősítését gyökér RNS-ből átírt cDNS mintán végeztük el, míg transzkripció starthelyének kísérletes megállapítására 5' RACE PCR módszert alkalmaztunk. Az eredmények alapján a *M. truncatula* LIN2 transzkripciója egy mintegy 100 bp-os szakaszon belül több helyről is elindulhat (4.6. ábra). A gén első exonjában, a megfelelő leolvasási keretben két, egymástól 522 bp távolságra eső ATG kodon is számításba jöhetett transzlációs starthelyként. Ezt az 5' RACE eredményekkel összevetve a LIN2 gén 5' UTR 22 és 141, bp illetve 544 és 663 bp között változna. A rövidebb szakasz felel meg jobban az irodalmi adatoknak, míg a második verzió lényegesen hosszabb lenne az átlagosnál (Mignone et al., 2002). A *M. truncatula* LIN2 aminosav szekvenciát összehasonlítottuk más fajokban teljes hosszúságban elérhető feltételezett ortológjaival, ahol a kódoló szakaszon 5' irányban előbb elhelyezkedő ATG kodon bizonyult konzerváltnak a szekvenciák között. Mindezen adatok alapján a leolvasási keretben a hosszabb szekvenciát adó ATG kodont jelöltük ki transzlációs starthelyként. A cDNS szekvenciát a genomi szekvenciával összevetve meghatároztuk a *M. truncatula* LIN2 gén exon-intron felépítését is (4.6. ábra). A LIN2 és LIN gének exon-intron szerkezete azok 5' végi harmadában különbözik lényegesen, a fennmaradó szakaszokon nagyfokú hasonlóságot mutat. A *M. truncatula* LIN2 gén genomi szekvenciája összesen 7323 bp, ami 15 exonra osztva egy 4008 bp-os kódoló szekvenciát határoz meg. Paralógja, a *M. truncatula* LIN 4467 bp-os kódoló szekvenciája összesen 16 exonon terül el, a genomi szekvencia azonban csupán 6773 bp, vagyis a LIN2 génben összességében hosszabb az intronikus szakasz, mint LIN-ben.

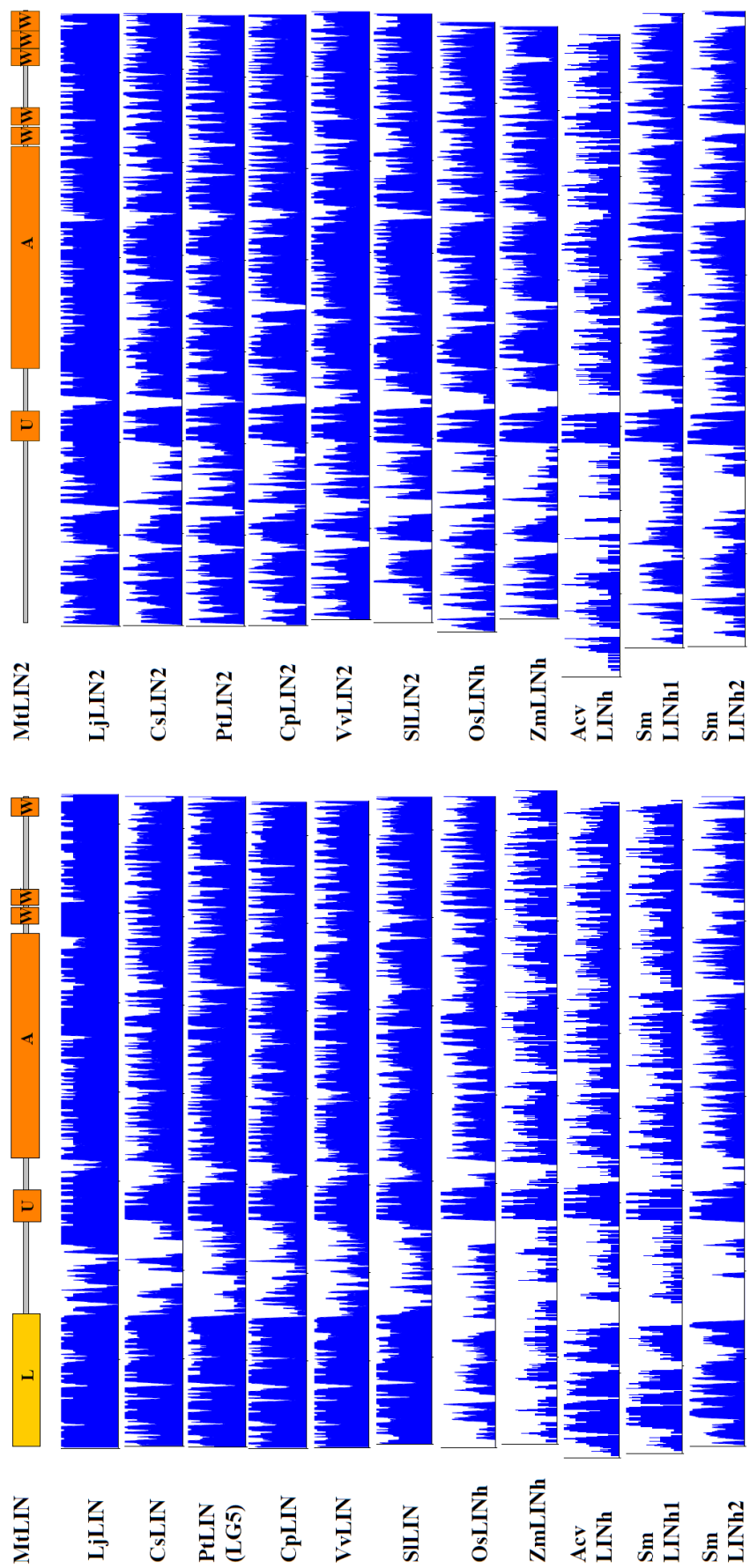
A LIN2 szekvenciát *in silico* lefordítottuk aminosav szekvenciává. Az 1335 aminosav hosszúságú *M. truncatula* LIN2 fehérje az attól valamivel hosszabb, 1488 aminosav hosszú LIN-nel páronkénti illesztésben 36%-os azonossági és 58%-os hasonlósági értékeket mutat. A LIN2 szekvencián végzett InterPro doménkeresés egy E3 ubikvitin ligáz aktivitásért felelős U-box domént, és további, fehérje-fehérje, vagy fehérje-DNS kapcsolatok kialakításában potenciálisan

szerepet játszó Armadillo és WD40 doméneket talált. Eredményeink alapján a LIN2 is egy E3 ubikvitin ligáz, mely doménfelépítésében igen hasonló a LIN fehérjéhez, de nem hordozza a LIN domént (4.7. ábra).

#### 4.2.1.4. További LIN2 homológ szekvenciák a növényvilágban

A *M. truncatula* LIN2 fehérje szekvenciájával adatbáziskereséseket végeztünk a *L. japonicus*, *C. sativus*, *P. trichocarpa*, *C. papaya*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum*, *O. sativa*, *Z. mays* és *S. moellendorffii* genomi, EST és fehérje szekvenciák között. A *P. trichocarpa* kivételével a kétszikű genomokban mindenütt kettő olyan teljes hosszúságú találatot kaptunk, melyek nagy fokú hasonlóságot mutattak a fehérje egészén. Egyik a 4.1. fejezetben már bemutatott LIN ortológ (*P. trichocarpa*-ban kettő kópiája létezik), a másik feltételezhetően LIN2 ortológja. Az egyszikűek csak egy találatot adtak, ezek a korábbiakban *O. sativa* és *Z. mays* LIN homológként hivatkozott szekvenciák. A *S. moellendorffii* csipkeharaszt esetében négy homológ fehérje szekvenciát találtunk, ezek közül 2-2 egyező hosszúságú, páronként 98%-ban azonos aminosav szekvenciával. A szakirodalom adatai alapján a *Selaginella* genomszekvenálás során két haplotípust szekvenáltak együtt (Banks et al., 2011), így vélhetően két lókuszt 2-2 alléljáról van szó, vagyis a kétszikűekhez hasonlóan a *S. moellendorffii* genom is kettő LIN homológ kópiát kódol. Az *A. capillus-veneris* teljes genom szekvenciája még nem ismert, így nem tudjuk, vajon abban is van-e egy másik LIN homológot kódoló gén is.

A LIN2 homológok genomi szakaszain egyes esetekben rendelkezésre álltak automatikus számítógépes kódoló szekvencia predikciók (pl. *P. trichocarpa*, *V. vinifera*), más esetekben csak a genomi DNS szekvencia volt elérhető (lásd mellékletek, 10. fejezet). Utóbbi esetekben a gének kódoló szekvenciáját a *M. truncatula* LIN2 aminosavszekvenciáját templátként használva *in silico* magunk prediktáltuk. Az így összegyűjtött, illetve meghatározott valamennyi aminosav szekvenciát ezután többszörös illesztésben hasonlítottuk össze. Ezen illesztések alapján, ahol szükséges volt, manuálisan javítottuk a számítógépes predikciók exon-intron határait, mind a saját, mind az adatbázisok predikcióin. Munkánk során a legnagyobb parszimóniára törekedtünk, feltételeztük, hogy a feltételezett ortológ fehérjék a lehető leghasonlóbbak egymáshoz. Ezek szerint megállapítottuk a *L. japonicus*, *C. sativus*, *P. trichocarpa*, *C. papaya*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* és *Z. mays* LIN2 fehérjék szekvenciáját. Az *O. sativa* és *S. moellendorffii* szekvencia predikciók szerkesztését, a valamennyi LIN2 homológot magába forlalt többszörös illesztés alapján, nem tartottuk szükségesnek, azokat az adatbázisokban közölt formában vizsgáltuk a további összehasonlításokban.



4.8. ábra (fekvő ábra, elforgatva)

---

**4.8. ábra.** A LIN és LIN2 fehérje szekvenciák konzerváltsága. Legfőlül a *M. truncatula* LIN (balról) és LIN2 (jobbról) fehérjék domén összetétele látható. A baloldali oszlopban minden fehérjét a *M. truncatula* LIN-hez, a jobboldali oszlopban a *M. truncatula* LIN2-höz hasonlítottunk. A fehérje domének jelölése megfelel a 4.5. ábra jelöléseinek. A grafikonok a *M. truncatula* LIN vagy LIN2, és az adott homológ szekvencia páronkénti illesztésének grafikus megjelenítései. A blosum62mt2 aminosav szubsztitúciós mátrix alapján az egyes illesztési pozíciókra számolt, 0 és 1 közé eső származtatott értékeket kék oszlopok jelzik, ezek az illesztés adott pozíciójában mért hasonlósági értékkel arányosak. Az ábra a VectorNTI (Invitrogen) programcsomag AlignX programjának felhasználásával készült. A kétszikű LIN és LIN2 szekvenciákat csak ortológjukkal vetettük össze, az egyszikű illetve haraszt LIN homológok mindkét összehasonlításban szerepelnek.

---

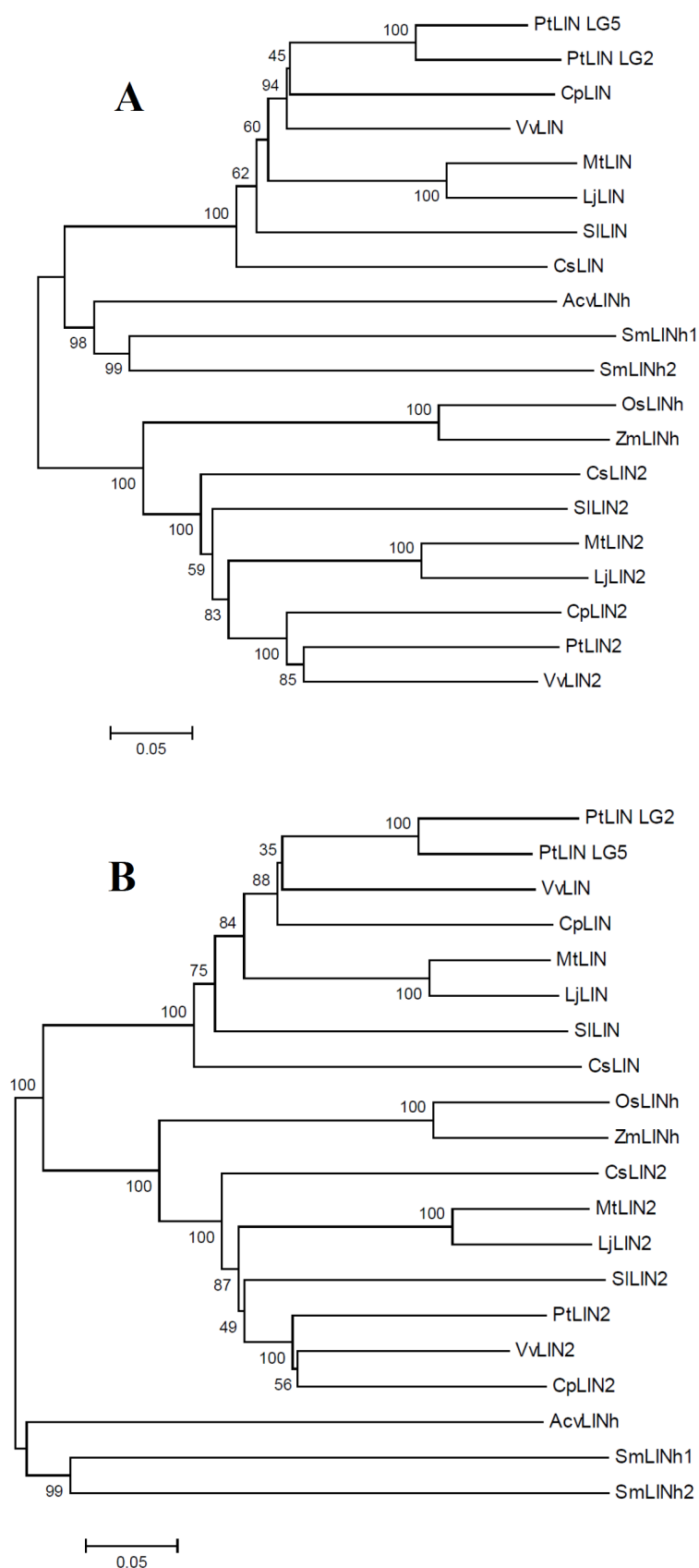
#### 4.2.2. A LIN és LIN2 fehérjék evolúciós viszonyainak feltárása

A *M. truncatula* LIN és LIN2 fehérjét egyenként, páronkénti illesztésben hasonlítottuk össze feltételezett kétszikű ortológjaikkal, illetve az egyszikű és haraszt szekvenciákkal (4.8. ábra). Ha a géncsalád két paralóg tagja által kódolt fehérjék, a LIN és LIN2 hasonlóságát nézzük, a szekvenciák két szakaszra bonthatóak: egy gyengébben konzervált, az U-box doménig terjedő N-terminális, és egy erősebben konzervált, az U-box doméntől a fehérjék végéig terjedő C-terminális szakaszra. (4.7. ábra). A két alcsalád közül csupán a LIN ortológ szekvenciákban megtalálható LIN domén a LIN alcsaládon belül magas fokú szekvencia konzerváltságot mutat. Ez a domén jól felismerhetően jelen van az *A. capillus-veneris* LIN homológ N-terminálisán is, ami arra utal, hogy az *A. capillus-veneris* LIN homológ inkább a LIN ortológja, mintsem LIN2-é. Ezzel szemben a LIN2 fehérjék N-terminális szakaszán kirajzolódó hasonlóság az összehasonlított szekvenciákat hordozó fajok közötti rendszertani távolság növekedésével rohamosan csökken (4.8. ábra).

A LIN homológok leszármazási kapcsolatainak vizsgálatához a rendelkezésünkre álló aminosav szekvenciák felhasználásával Neighbor-Joining filogenetikai fát rajzoltunk a teljes szekvenciák, és csupán az erősebben konzervált C-terminális szakaszok illesztésével is (4.9. ábra). Ennek eredményeként két, némiképp eltérő topológiájú fát kaptunk, de mindkettő egyértelműen három fő csoportba sorolja a vizsgált szekvenciákat. Egy monofiletikus csoportot alkotnak a kétszikű LIN ortológok, egy másikba tartoznak a kétszikű LIN2 ortológok és az egyszikűek LIN homológ kópiái, emellett egy harmadik kládot alkotnak a haraszt LIN homológ szekvenciák. A *S. moellendorffii* szekvenciák összehasonlítása 40%-ban azonos, illetve 60%-ban hasonló aminosavakat mutat a fehérjék illeszkedő szakaszain, ami összevethető a *M. truncatula* LIN és LIN2 (36/58%) egymáshoz mutatott értékeivel. Az adatok arra utalnak, hogy a *Selaginella* korpafű két LIN homológ kópiája nem új génduplikáció eredménye, hanem ez a faj is LIN és a LIN2 egy-egy ortológját hordozza. Valószínű, hogy egy nagyobb felbontású, a



harasztok és kétszikűek közötti rendszertani csoportok több fajából származó LIN homológ szekvenciát bevonó vizsgálat segítségével a *S. moellendorffii* szekvenciák is biztonsággal besorolhatóak lennének a LIN és LIN2 ortológok monofiletikus csoportjaiba.



4.9. ábra

---

**4.9. ábra.** LIN homológ szekvenciák alapján rajzolt filogenetikai fák. A fák NJ (Neighbor-Joining) módszerrel becsült nem gyökereztetett filogramok. Az egyes csomópontok melletti számok azok százalékos bootstrap támogatottságát (1000 ismétlés) jelölik. A fák ághosszai arányosak a szekvenciák közötti filogenetikai távolsággal, egységük egy szubsztitúció pozíciónként.

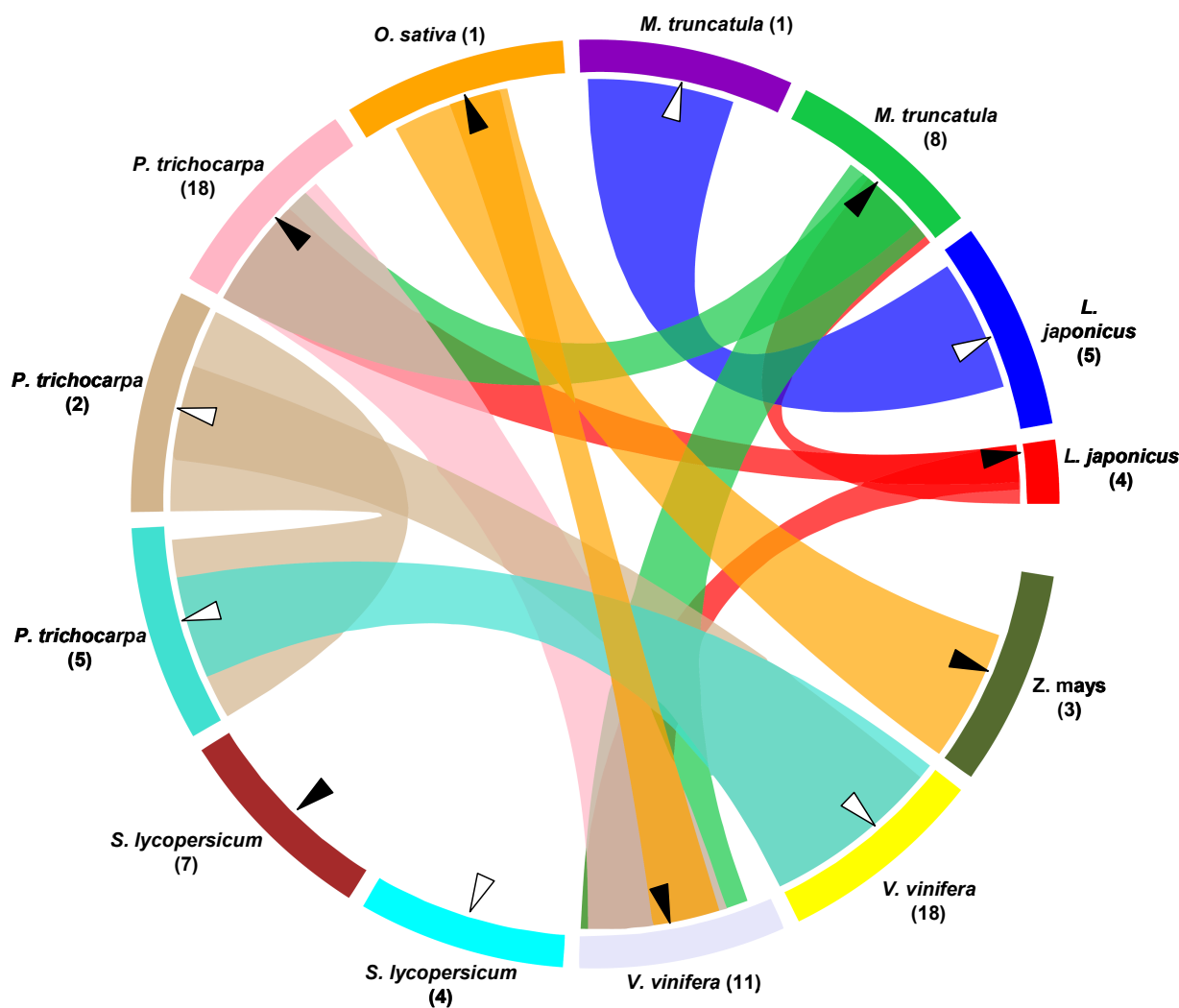
---

A *P. trichocarpa* két LIN szekvenciája mindkét fán monofiletikus párt alkot. Hosszuk azonos, páronkénti illesztésben 84%-os azonossági illetve 90%-os hasonlósági értékeket adnak. Emellett adatbázis kereséseink során egyetlen másik esetben sem találtunk két LIN ortológ kópiát egy genomban. Eredményeink alapján valószínű, hogy a *Populus LIN* gén duplikációja új esemény, azután történt, hogy a *P. trichocarpa* és a többi vizsgált faj fejlődési vonala külön vált a növények törzsfejlődése folyamán.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a *LIN* és *LIN2* gének mely kromoszómákon, milyen genomi környezetben helyezkednek el a különböző fajok genomjában. A *M. truncatula*, *L. japonicus*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum*, illetve az *O. sativa* és *Z. mays* genomok esetében állt rendelkezésünkre erre vonatkozó információ. A kétszikű fajok minden esetben külön kromoszómán hordozzák a *LIN* és *LIN2* géneket. A *P. trichocarpa* genom kettő *LIN* és egy *LIN2* ortológot kódol, ezek mindegyike más-más kromoszómán található. A vizsgált egyszikűek csupán 1-1 *LIN* homológot hordoznak. A rendelkezésre álló adatok alapján összevetettük a *LIN* kópiák 1-1 Mb kiterjedésű genomi környezetét. A szintenikus régiókat a 4.10. ábra mutatja be. A rendszertanilag közel álló fajok között a *LIN* homológok genomi környezete szintenikusnak mutatkozott, de mindig csak *LIN-LIN* illetve *LIN2-LIN2* ortológ párok esetén. *LIN-LIN2* paralóg párok genomi régiói egy alkalommal sem mutattak szintenikus egybeesést. A *P. trichocarpa LIN* ortológokat hordozó kromoszóma szakaszok kiterjedt homológ régiókat mutatnak, ami arra utal, hogy a *P. trichocarpa LIN* ortológ megkettőződése nem csak a gént, hanem nagyobb kromoszóma szakaszt érintő duplikáció eredménye. Az *O. sativa LIN* homológ genomi környezete szinténiát mutat a *V. vinifera* 11-es kromoszóma *LIN2* ortológot kódoló régiójával. *LIN* ortológ és egyszikű *LIN* homológ genomi környezete között nem mutattunk ki homológiát. Ezek alapján mind a felállított filogenetikai fák, mind a szinténia vizsgálat arra utal, hogy az egyszikű *LIN* homológok *LIN2* ortológjai. Érdekes eredmény, hogy míg a pillangósvirágú fajok *LIN2* genomi környezete hasonlóságot mutat *P. trichocarpa* és *V. vinifera LIN2* kromoszóma szakaszokkal is, addig a *M. truncatula* és *L. japonicus LIN* gének genomi környezete csak egymás között mutat szinténiát, más fajokkal nem.

További szekvenált növényi genomokban kereséseket végezve megtudtuk, hogy *LIN* és *LIN2* egy-egy kópiában megtalálható az ajakosvirágú (Lamiales) *Mimulus guttatus* és a legbazálisabb helyzetű valódi kétszikű (Eudicotidae) klád (4.1. ábra), a boglárkavirágúak (Ranunculales) közé sorolt *Aquilegia coerulea* genomjában is. Míg kétszikű csoportokban *LIN* és

*LIN2* meglete általánosnak mondható, addig a vizsgált egyszikűekben csak *LIN2* ortológja létezik. Egyáltalán nem találtunk feltételezett *LIN* illetve *LIN2* géneket a *Physcomitrella patens* moha, *Volvox carteri* telepes zöldalga illetve a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga elérhető genomszekvenciájában.



**4.10. ábra.** Szinténikus kapcsolatok a *LIN* homológokat hordozó genomi régiók között. Az összehasonlításokat 1 Mb kiterjedésű genomi szekvenciákon végeztük, a fajnevek mellett zárójelben tüntettük fel az adott szekvenciát hordozó kromoszóma számát. (A *L. japonicus* 4. kromoszóma adott szakasza csak részlegesen szekvenált, ott kevesebb szekvencia információ állt rendelkezésünkre.) A kromoszóma szakaszokon háromszögek jelölik a *LIN* homológok elhelyezkedését. Fehér kitöltéssel láthatóak a *LIN* ortológok, fekete kitöltéssel a *LIN2* ortológok, és az egyszikűek *LIN* homológ szekvenciái.

### 4.3. A *LIN* géncsalád funkcionális vizsgálata

Ahogy az előző fejezetben bemutattuk, a *LIN* és *LIN2* gének széles körben elterjedtek a magasabbrendű növényi genomokban. Jól konzerváltak megtalálhatóak nitrogénkötő szimbiózisra nem képes fajokban is. Eddig csak a pillangósvirágúak *LIN* génjeihez köthető egy, a szimbiózisban betöltött funkció. Ennek hiányában, mutánsaikban leáll az infekciós fonal növekedése még a gyökérszőrökben, és a gümőprimordiumok sem fejlődnek tovább. Ugyanakkor tekintve a többi növényben is meglévő *LIN* kópiát, és azt, hogy a fehérje E3 ubikvitin ligázként több szubsztrát molekula ubikvitinációjában is szerepet játszhat, felmerül annak a lehetősége, hogy a *LIN* rendelkezik feladatokkal a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepén túl is. A doménekben kapott nagyfokú hasonlóságok alapján feltételezhető, hogy más folyamatokban hasonló szubsztrát-specifitással rendelkezhetnek a különböző fajokban működő *LIN* fehérjék, de vajon mennyire egyedi a pillangósvirágúak *LIN* fehérjéinek szimbiózisban betöltött szerepe? Annak vizsgálatára, hogy *LIN* milyen mértékben specializálódott a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepének ellátására, *lin* mutáns növényeken menekítési kísérleteket végeztünk a nem gümöző fajokból származó *V. vinifera* és *A. capillus-veneris* *LIN* homológ szekvenciákkal. Emellett a *M. truncatula* *LIN2* funkciójának feltárására irányuló vizsgálatokat is végeztünk, mert annak működéséről korábban semmilyen kísérletes adat nem állt rendelkezésre.

#### 4.3.1. *M. truncatula* *lin* mutáns növények menekítési kísérletei

A *M. truncatula* *lin-2* allélt hordozó mutáns növényekben (EMS6:T7 vonal) a *LIN* gén első exonjának 661. pozíciójában egy C > T tranzíció (4.6. ábra) korai stop kodont alakít ki (Kiss et al., 2009). Erről a mutáns allélról csak egy 220 aminosav hosszúságú csonkolt *LIN* képződhet, mely nem elégséges a *LIN* szimbiotikus funkciójának betöltésére, tehát a szimbiózis a már említett módon korán leáll. Korábban ezen *lin-2* mutáns növényeken transzkomplementációs kísérletekben a vad típusú *MtLIN* génnel sikerült komplementálni a szimbiotikus fenotípust (Kiss et al., 2009). Jelen kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a klónozott *LIN* homológok fehérje termékei vajon képesek-e ellátni a *LIN* géntermék szimbiózisban betöltött szerepét.

növény genotípusa	promóter	transzgén	$\Sigma$ komp.	$\Sigma$ transz.	$\Sigma$ növény	vektor
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>GUS</i>	0	16	26	pK7WG2D
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>cMtLIN</i>	3	30	46	pK7WG2D
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>cVvLIN</i>	2	26	28	pK7WG2D
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>cAcvLINh</i>	2	43	78	pK7WG2D
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>GUS</i>	0	36	47	pK7WGF2-RR
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>cMtLIN</i>	11	20	20	pK7WGF2-RR
<i>lin-2</i>	<i>p35S</i>	<i>cAcvLINh</i>	10	33	40	pK7WGF2-RR
<i>lin-2</i>	<i>pMtLIN</i>	<i>cVvLIN</i>	7	na	16	pK7WGF2-RR
<i>lin-2</i>	<i>pMtLIN</i>	<i>cAcvLINh</i>	15	na	45	pK7WGF2-RR
<i>lin-2</i>	<i>pMtLIN</i>	<i>cMtLIN</i>	21	na	35	pK7WGF2-RR

**4.11. ábra.** A *lin-2* mutáns *M. truncatula* növényeken végzett menekítési kísérletek összefoglaló táblázata. A transzgén kifejeztetésére különböző promótereket használtunk: a konstitutív kifejeződést biztosító karfiol mozaik vírus 35S promóterét (*p35S*), és a *M. truncatula LIN* gén promóterét (*pMtLIN*). A menekítő konstrukciókban használt transzgének:  $\beta$ -glükuronidáz (*GUS*), mint negatív kontroll, a *M. truncatula LIN* gén kódoló szekvenciája (*cMtLIN*), a *V. vinifera LIN* gén kódoló szekvenciája (*cVvLIN*), az *A. capillus-veneris LIN* homológ gén kódoló szekvenciája (*cAcvLINh*).  $\Sigma$  komp. - a menekített növények száma, melyeken 6 héttel *S. medicae* WSM419 inokuláció után a vad típusúakkal megegyező felépítésű érett, szimbionták által kolonizált gümők voltak megfigyelhetők.  $\Sigma$  transz. - a transzformációs kontroll kifejeződése alapján az adott konstrukciót valóban hordozó transzformáns növények száma.  $\Sigma$  növény – a kísérletek kiértékelésekor megvizsgált kifejezett növények száma. A transzgének komplementációs képességét több esetben különböző transzformációs vektorok alkalmazásával is ellenőriztük. A számok a független biológiai kísérletek összesített értékei.

A *LIN* promóter által hajtott konstrukciók esetében transzformációs kontroll nem állt rendelkezésre (lásd 3. fejezet), így ott a transzformáns növények számára vonatkozóan nincsen adat (na).

#### 4.3.1.1. A *V. vinifera LIN* kópiával végzett menekítési kísérletek

A *M. truncatula* és *V. vinifera LIN* fehérjék páronkénti illesztése szerint azok 65%-ban azonosak és 78%-ban hasonlóak az illeszkedő szakaszokon (4.7. ábra). A csak az U-box doméntól a fehérjék C-terminálisáig terjedő szakaszokat összehasonlítva ezek az értékek: 68% és 81%. A *V. vinifera LIN* gén kódoló szekvenciáját (*cVvLIN*) *Agrobacterium rhizogenes* által közvetített ún. „hairy root” gyökértranszformációval juttattuk a *lin-2* mutáns növényekbe. Több konstrukciót teszteltünk: a karfiol mozaik vírus 35S promótere (*p35S*) a transzgén konstitutív kifejeztetését teszi lehetővé a transzformáns gyökerekben, míg a *M. truncatula LIN* gén klónozott promóterével (*pMtLIN*) meghajtva a transzgén térben és időben hasonlóan fejeződik ki, mint natív módon a *LIN*, melynek a mutánsban kieső funkcióját próbáltuk pótolni a

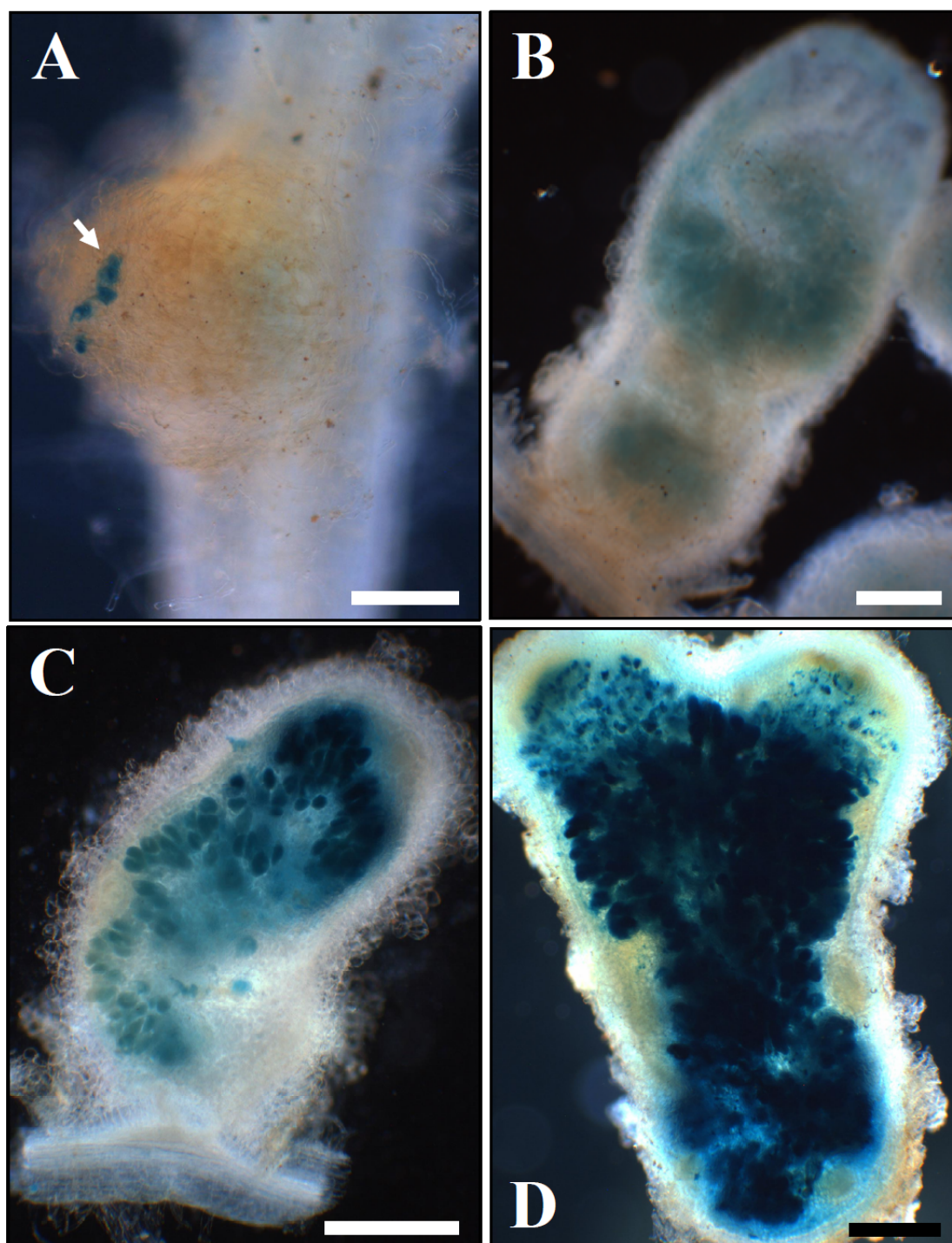
komplementációs tesztekben. Negatív kontrollként *p35S*-sel meghajtott  $\beta$ -glükuronidáz-t (*GUS*), pozitív kontrollként a *M. truncatula* *LIN* gén kódoló szekvenciáját (*cMtLIN*) használtuk *p35S* illetve *pMtLIN* által meghajtvva. A *p35S* kifejeztetést biztosító plazmidba klónozott célgénekről a fehérjék fúziós fluoreszcens fehérje nélkül termelődtek, ugyanakkor párhuzamosan egy másik promóter által meghajtott szabad fluoreszcens fehérje is képződött, melyet pozitív transzformációs kontrollként használtunk. A *pLIN*-t hordozó plazmidokba beépített célgének az N-terminális végükön transzlációs fúzióban GFP-vel jelölt fehérjeterméket eredményeztek. Bár elméletileg ez a vektor is hordozott egy másik, különálló, szabad fluoreszcens fehérjét kifejeztető konstrukciót is, a *pLIN*-t hordozó plazmidokkal végzett kísérletekben technikai okok miatt (lásd 3. fejezet) nem rendelkezünk transzformációs kontrollal. Az ezeket a konstrukciókat hordozó *A. rhizogenes* törzsekkel elvégeztük a „hairy root” transzformációt, majd a kinőtt gyökereket mikroszimbionta baktériumokkal fertőztük. A komplementáció sikerességét a növények *Sinorhizobium medicae* WSM419 inokulációja után 6 héttel ellenőriztük. A negatív kontroll esetében összesen 26 kifejlett növényt vizsgáltunk. Közülük a transzformációs kontroll kifejeződése alapján 16 egyed hordozott transzformáns gyökereket, de a növények közül egy sem mutatott kifejlett, szimbiontákat tartalmazó gümőket (4.11. ábra). A gümők megrekedtek a primordium fázisban, a szimbiotikus infekció leállt (4.12. ábra). Ezzel szemben mind a *p35S-cVvLIN2* (4.12. ábra), mind a *pMtLIN-cVvLIN* konstrukció képes volt menekíteni a *lin-2* mutációt. Az előbbi esetben 26 transzformáns (összesen 28 vizsgált) növényből 2, a második esetben 16 vizsgált növényből 7 mutatott a vad típusú növények elongált, rózsaszín, szimbiontákkal kolonizált kifejlett gümőivel azonos képleteket (4.11. ábra). A pozitív kontrollokat illetően: 46 vizsgált növény közül 30 hordozott transzformáns gyökereket a *p35S-cMtLIN* konstrukció alkalmazásakor, melyek közül 3 gyökérzetén találtunk kifejlett, szimbiontákkal fertőzött gümőket (4.12. ábra), míg a *pMtLIN-cMtLIN* konstrukció használatakor 35 vizsgált növény közül 21 volt képes szimbiotikus gümők kialakítására (4.11. ábra). A tesztek eredménye arra utal, hogy a *VvLIN* fehérje megfelelő kifejeztetés mellett képes ellátni *LIN* szerepét a nitrogénkötő szimbiózis kialakítása folyamán.

---

**4.12. ábra.** Gyökérgümők a *p35S* promóterrel hajtott konstrukciókkal menekített *M. truncatula* *lin* mutáns növényeken 6 héttel inokuláció után. A transzgének fehérjetermékei szabadon, fúziós fehérje nélkül termelődtek. Szimbiontaként a *hemA* promóterrel meghajtott *lacZ* gént hordozó *S. medicae* WSM419 törzset használtuk. Ezek a baktériumok  $\beta$ -galaktozidáz festés után kék színnel láthatóak a képeken.

---

A: negatív kontroll, a nem menekítő konstrukcióval transzformált gyökereken a baktériumok (fehér nyílal jelölve) nem képesek kolonizálni a fejlődő gümőt, annak fejlődése primordium állapotban leáll. B: pozitív kontroll, a *M. truncatula* LIN kódoló szekvenciájával menekített, szimbiotákat tartalmazó gümő. A *V. vinifera* LIN (C) és az *A. capillus-veneris* LIN homológ (D) kódoló szekvenciája is képes volt menekíteni a *lin* mutációt, a kifejezett gümők belső sejtömegét kékre színezik az azt kolonizáló baktériumok. A és B képeken a gümők egészben, C és D-n ketté metszve láthatóak. [Arányvonal: 500  $\mu$ m (A), 1000  $\mu$ m (B-D).]

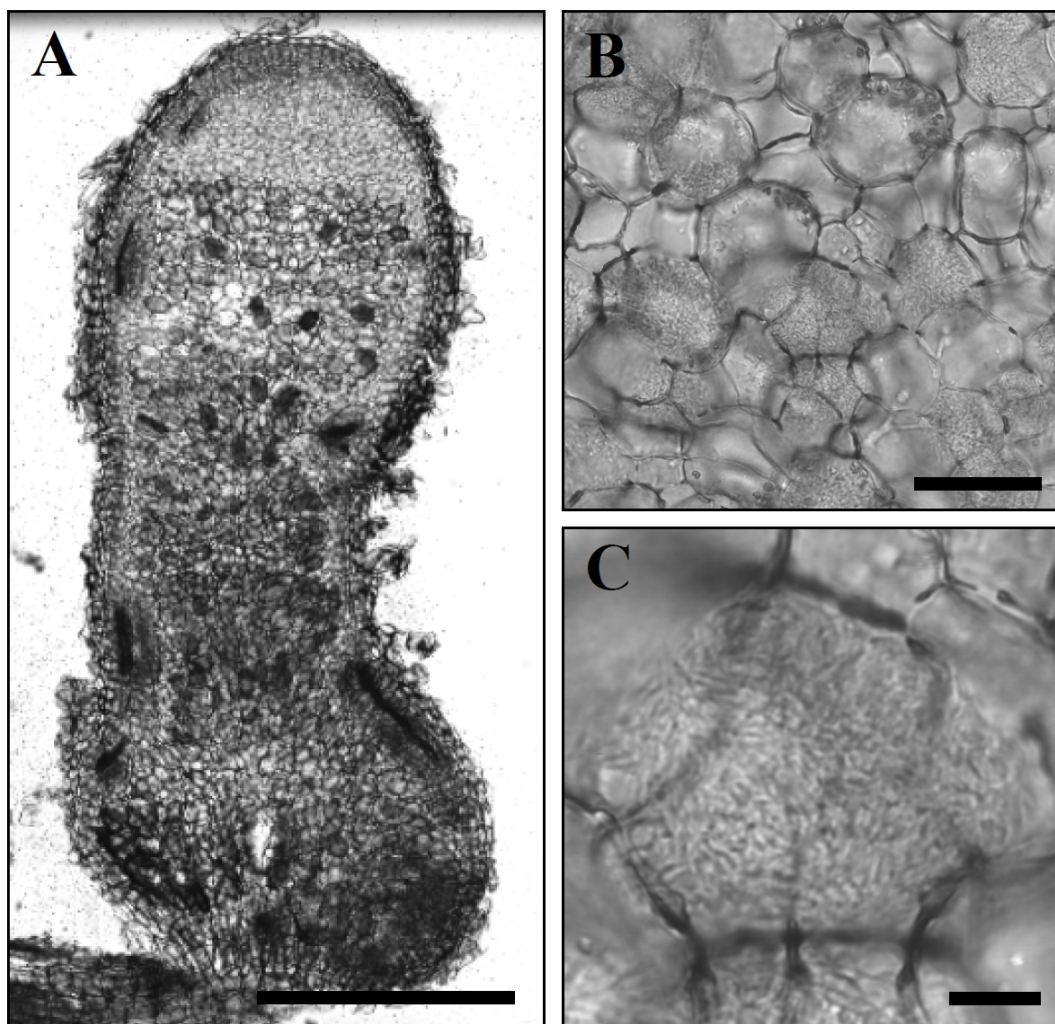


4.12 ábra

#### 4.3.1.2. Az *A. capillus-veneris* LIN kópiával végzett menekítési kísérletek

A Lycophyta csoport fejlődése mintegy 400 millió évvel ezelőtt levált a szárazföldi növények fő fejlődési vonaláról (Stewart, 1993). Ily módon a Lycophyta *A. capillus veneris* LIN homológ és a *M. truncatula* LIN legalább 400 millió éve egymástól függetlenül fejlődik, meglepő módon a két fehérje illeszkedő szakaszain az aminosavak mégis 40%-ban azonosak, illetve 61%-ban hasonlóak (4.7. ábra). Ha csak a prediktált, ismert funkcionális doméneket hordozó, az U-boxtól a fehérjék C-terminálisáig tartó szakaszokat illesztjük, ezek az értékek 42 és 64%-ra emelkednek. A fehérjék hasonlósága összemérhető a *M. truncatula* LIN és LIN2 paralóg pár értékeivel. Ugyanakkor az *A. capillus veneris* LIN homológ N-terminálisán felismerhetően jelen van a kizárólag a LIN ortológokra jellemző egyedi domén. Menekítési kísérletekben az *A. capillus veneris* LIN homológ kódoló szekvenciáját (*cAcvLINh*) az előző fejezetben leírtakhoz hasonlóan, *p35S* illetve *pMtLIN* promóterekkel meghajtva, *A. rhizogenes* közvetítette gyökertranszformációval juttattuk *lin-2* mutáns növényekbe. A *p35S*-sel meghajtva két különböző vektorról is kifejeztettük a transzgént. A pK7WG2D vektorról az *AcvLINh* fehérje szabadon, míg a pK7WGF2-RR vektorról N-terminális fluoreszcens fúziós fehérjével együtt termelődik. Mindkét vektorról termelődik egy-egy független promóterről hajtott fluoreszcens transzformációs kontroll is, így kiválogathattuk a transzformált gyökerekkel rendelkező növényeket. A pLIN által hajtott konstrukciókat a pK7WGF2-RR vektor módosított változatával készítettük, itt a már említett technikai okok miatt transzformációs kontroll nem állt rendelkezésre (lásd 3. fejezet). *S. medicae* WSM419 inokuláció után 6 héttel, a *p35S-cAcvLINh* konstrukciókkal kapott transzformáns gyökereket vizsgálva 43 transzformáns (összesen 78 vizsgált) növényből 2 (pK7WG2D), illetve 33 transzformáns (összesen 40 vizsgált) növényből 10 (pK7WGF2-RR) (4.12. ábra) mutatott komplementációt. Emellett 45 vizsgált, a *pMtLIN-cAcvLINh* konstrukciót potenciálisan hordozó növényből 15 esetén figyeltünk meg érett, elongált, rózsaszín, funkcionális, szimbiontákkal kolonizált gümöket (4.13. ábra). Ezzel párhuzamosan a pK7WGF2-RR vektor alkalmazásakor, a pozitív kontrollokat illetően: a *p35S-MtLIN* konstrukciót hordozó 20 transzformáns (összesen 20 vizsgált) növényből 11, a *pMtLIN-MtLIN* konstrukció esetén 35 vizsgált közül 21 növény volt képes érett, szimbiontákat tartalmazó gümöket kialakítani. A *p35S-GUS* (negatív kontroll) konstrukcióval kapott 36 transzformáns gyökereket hordozó (összesen 47 vizsgált) egyedből egy esetben sem alakultak ki szimbiotikus gümők az inokulált gyökereken (4.11. ábra). A távoli rokon *A. capillus-veneris* páfrány fajból származó, de aminosav szekvencia szinten jól konzervált LIN homológ tehát képes menekíteni a szimbiotikus *lin* mutációt a *M. truncatula* növényben.





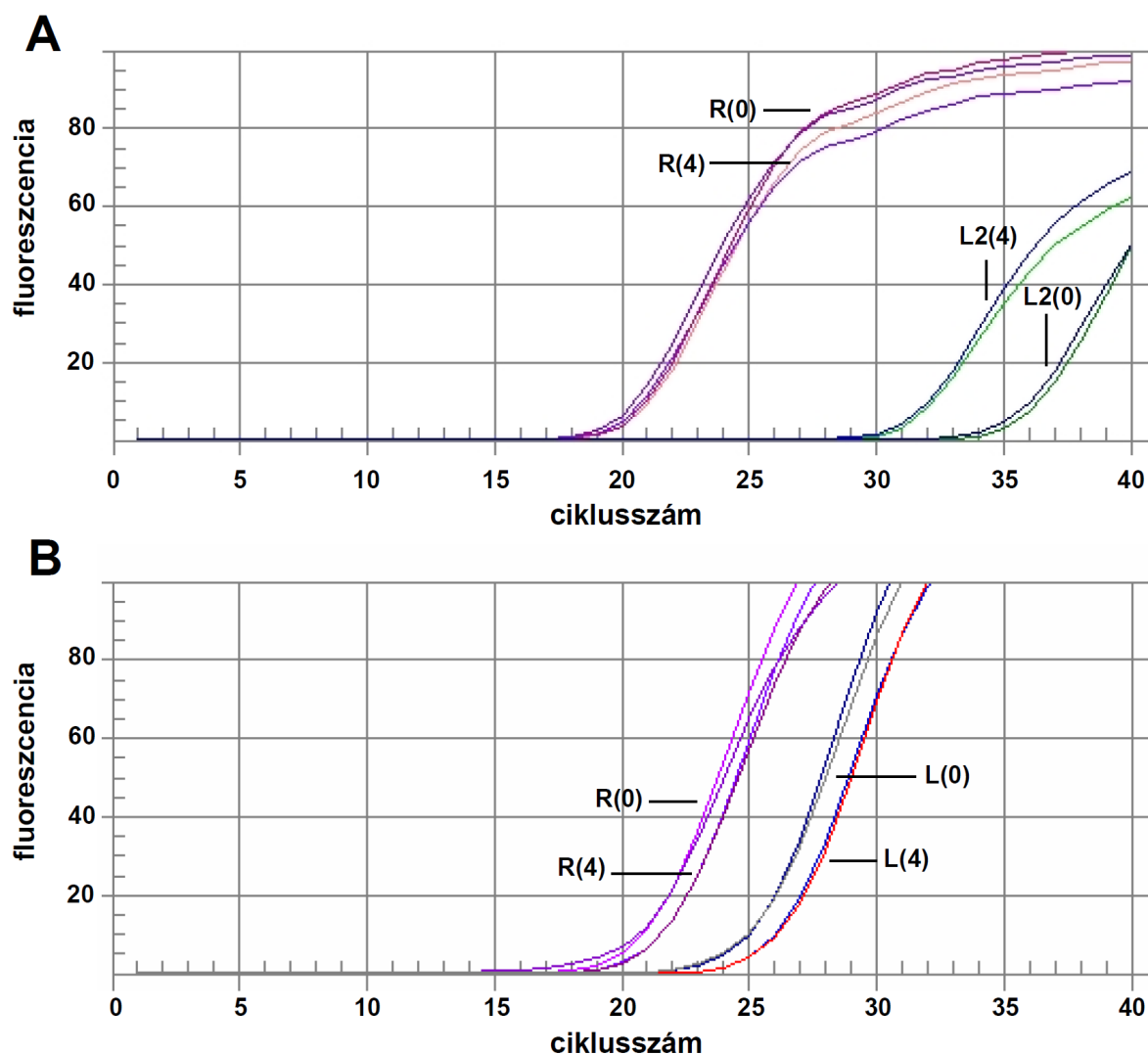
**4.13. ábra.** Érett gümők metszeti képe *LIN* promóterrel hajtott *A. capillus-veneris* *LIN* homológ kódoló szekvenciával menekített *M. truncatula* *lin-2* mutáns növényeken. A *S. medicae* WSM419 törzsszel fertőzött gyökereken 6 héttel inokuláció után a vad típusúakkal megegyező felépítésű érett gümők voltak megfigyelhetők (A), amit a szimbionták kolonizáltak (B,C). A C képen kivehetőek a sejtet kitöltő baktériumok. [Arányvonal: 750 μm (A), 50 μm (B), 10 μm (C).]

#### 4.3.2. A *M. truncatula* *LIN2* funkcionális vizsgálata

A *LIN* homológ szekvenciák közül funkcionális információval korábban csupán a *M. truncatula* *LIN* és *L. japonicus* ortológja, *CERBERUS* (Yano et al., 2009) (a könnyebb követhetőség érdekében ebben a munkában *L. japonicus* *LIN* néven hivatkozunk rá) esetében rendelkezünk, a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött funkciójuk kapcsán. A *LIN2* génekről semmit nem tudtunk. A *LIN* és *LIN2* gének széles körben megtalálhatók nem gümöző növényfajok genomjában is, emellett géntermékeik domén összetétele és szekvenciája is igen

hasznos. Ez egyfelől azt sugallja, hogy a *LIN* rendelkezik a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepén túl egyéb funkcióval is, másfelől a *LIN* és a *LIN2*, legalább részben, képes lehet azonos feladatok elvégzésére.

Több különböző *M. truncatula* és *L. japonicus* *lin/cerberus* allélt hordozó mutáns létezik, ezekben a *LIN2* kópia sértetlenül jelen van a genomokban, a szimbiózis defektív fenotípus mégis megjelenik. Ez arra utal, hogy a jelen lévő *LIN2* nem képes ellátni a kieső szimbiotikus funkciót. Kérdés, hogy vajon miért nem? A fehérjék illesztése azt mutatta, hogy az N-terminális részen van a legnagyobb különbség a két paralóg között, de a további domén összetétel megegyezik. Elképzelhető, hogy a *LIN*-hez képest megváltozott fehérje nem képes a szimbiotikus funkcióhoz szükséges szubsztrát molekula ubikvitinációjában részt venni. Ugyanakkor az is lehet, hogy képes lenne rá, csak a *LIN2* gén kifejeződése, vagy a fehérje lokalizációja nem megfelelő ahhoz, hogy ezt a feladatot elvégezze. Az alábbi kísérletekben több oldalról vizsgáltuk a *LIN2* gén és fehérje termékének olyan tulajdonságait, melyek közelebb vihetnek funkciójának megértéséhez.



4.14. ábra

---

**4.14. ábra.** A *M. truncatula* *LIN2* és *LIN* gének expressziója gyökerekben. Az x tengely a kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) aktuális ciklusszámát, az y tengely a mért fluoreszcens jel intenzitását mutatja. A mérések azonos cDNS templátokon készültek: szimbiontával nem inokulált (0), és szimbionta inokuláció után 4 nappal (4) gyűjtött gyökereken.

Az **A** részára a *LIN2* specifikus (L2), a **B** részára a *LIN* specifikus (L) primerekkel mért értékeket mutatja két független PCR futásban, 2-2 technikai ismétléssel, a belső referencia (R) eredményei mellett. Referencia génként a *MtACTIN2*-t használtuk.

---

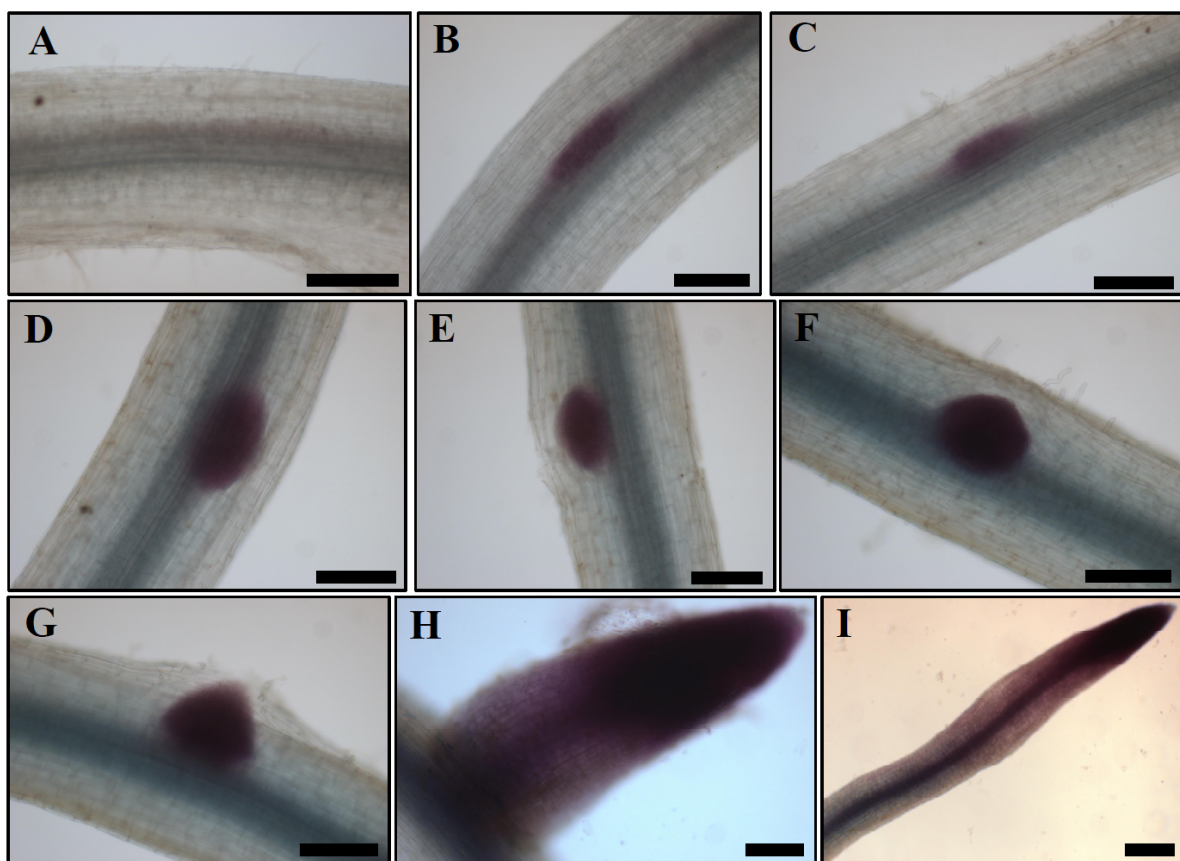
#### 4.3.2.1. A *MtLIN2* gén kifejeződése

A *MtLIN2* gén kifejeződését a gyökérben, valamint egy korai szimbiotikus állapotban vizsgáltuk kvantitatív valós idejű PCR-rel. Ennek megfelelően RNS mintákat tisztítottunk *M. truncatula* növények sterilén nevelt gyökeréről, és azonos korú, de négy nappal korábban *Rhizobium* baktériummal fertőzött gyökerekről is, a gyökérszörös zónákból. A reverz transzkripció reakció elvégzése után kapott cDNS mintákon összemértük a PCR reakciókat az *MtLIN2* primerekkel, és a referencia gén, *MtACTIN2* primereivel is (4.14. A ábra). Az adatok alapján a *LIN2* gén nagyon alacsonyan fejeződik ki a gyökérben, míg expressziója kb. egy nagyságrenddel növekedett ( $15,81 \pm 1,1$ -szeres emelkedés) a szimbionta inokuláció után. Összehasonlításképpen ugyanezen cDNS templátokon elvégeztük a *MtLIN* hasonló analízisét is (4.14. B ábra). A *LIN* gén kifejeződése a vizsgált minták összevetésében gyakorlatilag nem mutatott változást. Bár ezekből az adatokból a két gén kifejeződésének direkt összehasonlítását számszerűen nem adhatjuk meg (a különböző primerekkel végzett PCR-ek hatékonysága nem meghatározott), az mindenképp kitűnik, hogy a *LIN2* mRNS-ének szintje még a lehetséges szimbiotikus indukció után is jóval alatta maradt az átírt *LIN* géntermék mennyiségének (4.14. ábra). A vizsgálatokban belső (normalizációs) referenciaként a *MtACTIN2* gént használtuk.

---

**4.15. ábra.** A *M. truncatula* *LIN2* gén promóter aktivitása a gyökérfejlődés folyamán. A *LIN2* promóter *GUS* riporter gént hajt meg a transzformáns gyökerekben, ami  $\beta$ -glükuronidáz festés után magenta színnel látható a felvételeken. A *LIN2* promóter aktivitása a gyökér periciklusban elinduló sejtosztódással együtt jelenik meg (**A**), majd a primordium teljes sejtömegén megfigyelhető erős aktivitás végigkíséri az oldalgyökér fejlődésének egész folyamatát (**A-H**), végül lecseng, csak a gyökércsúcsokban marad fenn permanensen (**I**). [Arányvonal: 200  $\mu$ m (**A-H**), 500  $\mu$ m (**I**).]

---

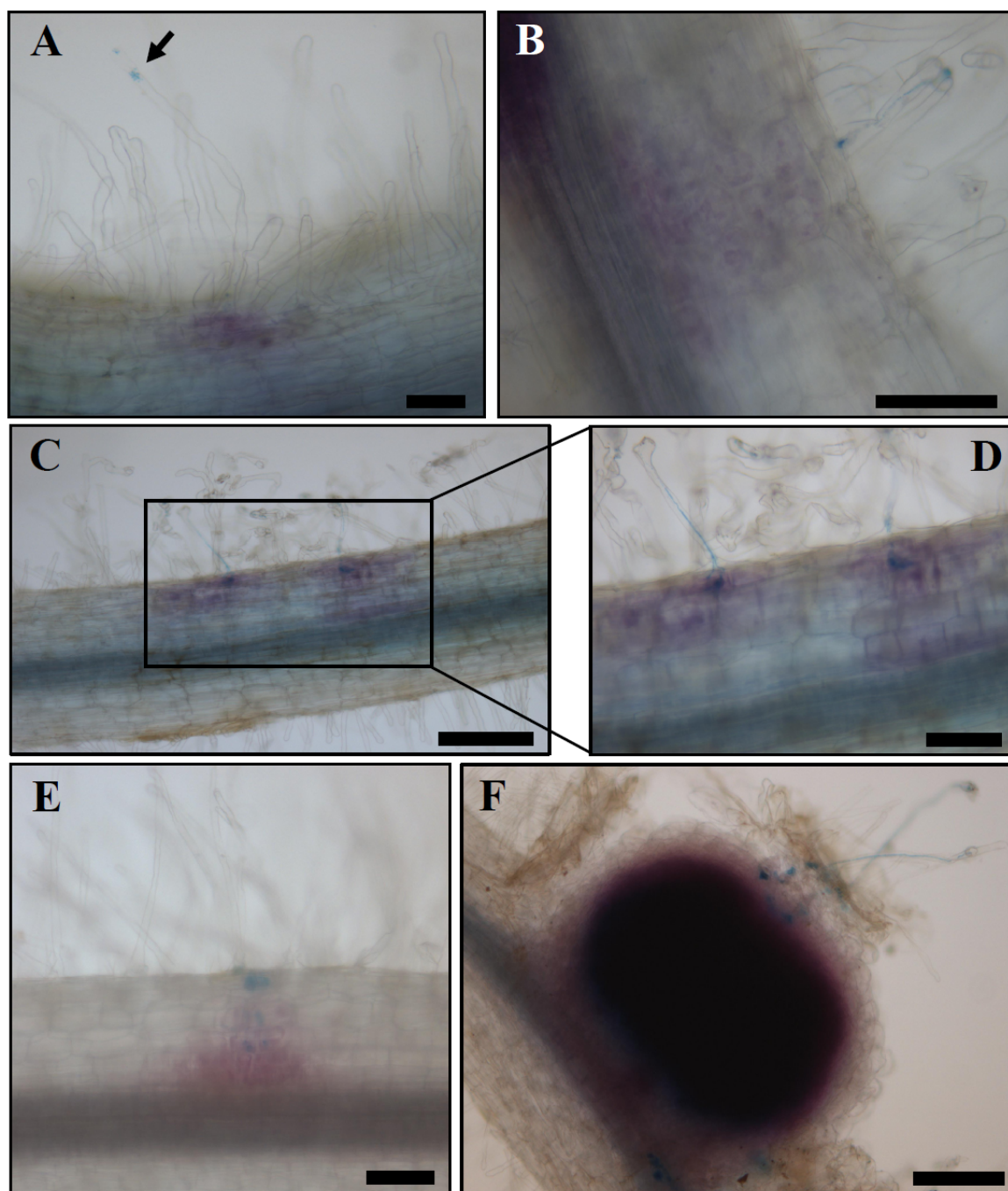


4.15. ábra

#### 4.3.2.2. A *LIN2* promóter aktivitásának jellemzése

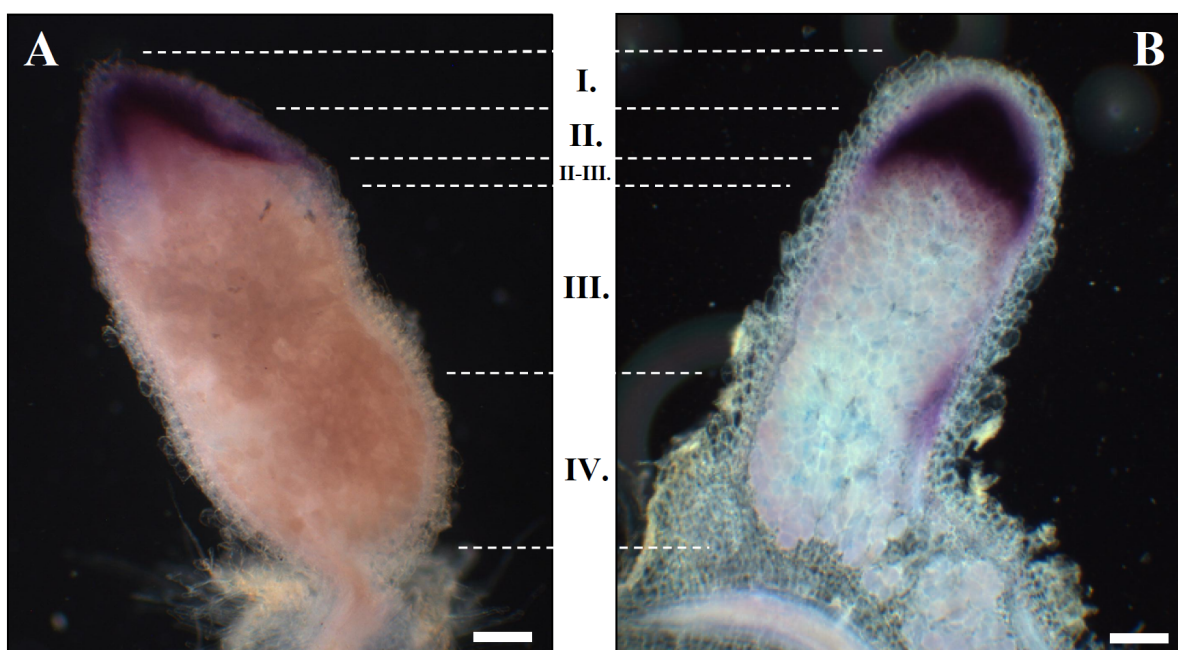
A *LIN2* gén kifejeződésének finomabb térbeli vizsgálatához klónoztuk a gén kezdő kodonját közvetlenül megelőző 2156 bp-t, melyet *LIN2* promóterként (*pMtLIN2*) használtunk a későbbi vizsgálatokban. Működésének láthatóvá tételéhez *GUS* riporter gént hajtottunk meg vele, ami megfelelő festés után megszínezi a *LIN2* promóteraktivitást mutató sejteket. A konstrukciót *A. rhizogenes* közvetítette gyökertranszformációval juttattuk vad típusú A17 Jemalong *M. truncatula* növényekbe. Figyeltük a promóteraktivitást nem inokulált, nitrogénnel elégségesen ellátott, és nitrogén éheztetett növények gyökerein, valamint *S. medicae* WSM419 szimbionta inokuláció után 1, 3, 7, 21 és 28 nappal. Nem inokulált gyökereken nitrogénellátottságtól függetlenül erős promóteraktivitást tapasztaltunk a gyökércsúcsokban, illetve a fejlődő oldalgyökerekben, a gyökér egyéb részein nem láttunk festődést. A *pMtLIN2* már az oldalgyökérfejlődés legkorábbi fázisában bekapcsol a gyökér periciklus osztódó sejtjeiben, majd folyamatos erős aktivitást mutat a fejlődő gyökér teljes sejtömegén, míg lecseng, és a kialakult gyökér csúcsi részére korlátozódik (4.15. ábra).





**4.16. ábra.** A *M. truncatula* *LIN2* gén promóteraktivitása a gümőfejlődés és szimbiotikus infekció folyamán. A *LIN2* promóter *GUS* riportert gént hajt meg a transzformáns gyökerekben, ami  $\beta$ -glükuronidáz festés után magenta színnel látható a képeken. A felvételek *S. medicae* WSM419 inokuláció után 7 nappal készültek a gümőfejlődés és szimbiotikus infekció különböző fázisaiban járó gyökérrészekben. A szimbionta törzs *hemA* promóterrel meghajtott *lacZ* gént hordoz,  $\beta$ -galaktozidáz festés után kék színnel látható a képeken. A gyökérszőr csúcsán megjelenő baktérium kolónia (fekete nyíllal jelölve) kialakulásával párhuzamosan a környező epidermisz sejtekben erősödő *LIN2* promóteraktivitás jelenik meg (A), ami az infekció előrehaladtával áttevődik a gyökér belső sejtrétegeibe (B-D), majd a gümőprimórdiumban koncentrálódik (E). A már szimbionták által kolonizált, de még fejlődő gümőben erős *LIN2* promóteraktivitás figyelhető meg (F). [Arányvonal: 100  $\mu$ m (A,B,D,E), 200  $\mu$ m (C,F).]

Szimbionta fertőzés hatására a promóter aktív az infektált gyökérszőr környezetében elhelyezkedő epidermisz sejtekben, majd a fertőzés, illetve az infekciós fonal előrehaladásával egyre mélyebben elhelyezkedő sejtrétegekre tevődik át az aktivitása, míg a fejlődő gümőprimordiumban koncentrálnak (4.16. ábra). Az érett, elongált, szimbiontákkal fertőzött gümőkben a promóter erősen aktív az osztódási zónában, ez azonban az infekciós zónában lecseng, a kifejlett gümő egyéb területein a *MtLIN2* promóter nem aktív (4.17. A ábra). Ez nagyon hasonló, de nem egyező a *MtLIN* promóter hasonló korú, érett gümőben tapasztalt aktivitási képével, ami a merisztematikus zónán túl erősen működik a szimbiotikus infekció zónájában is. A gümő további részeiben ez az aktivitás megszűnik, vagy nagyon gyenge lesz (Kiss et al., 2009) (4.17. B ábra).



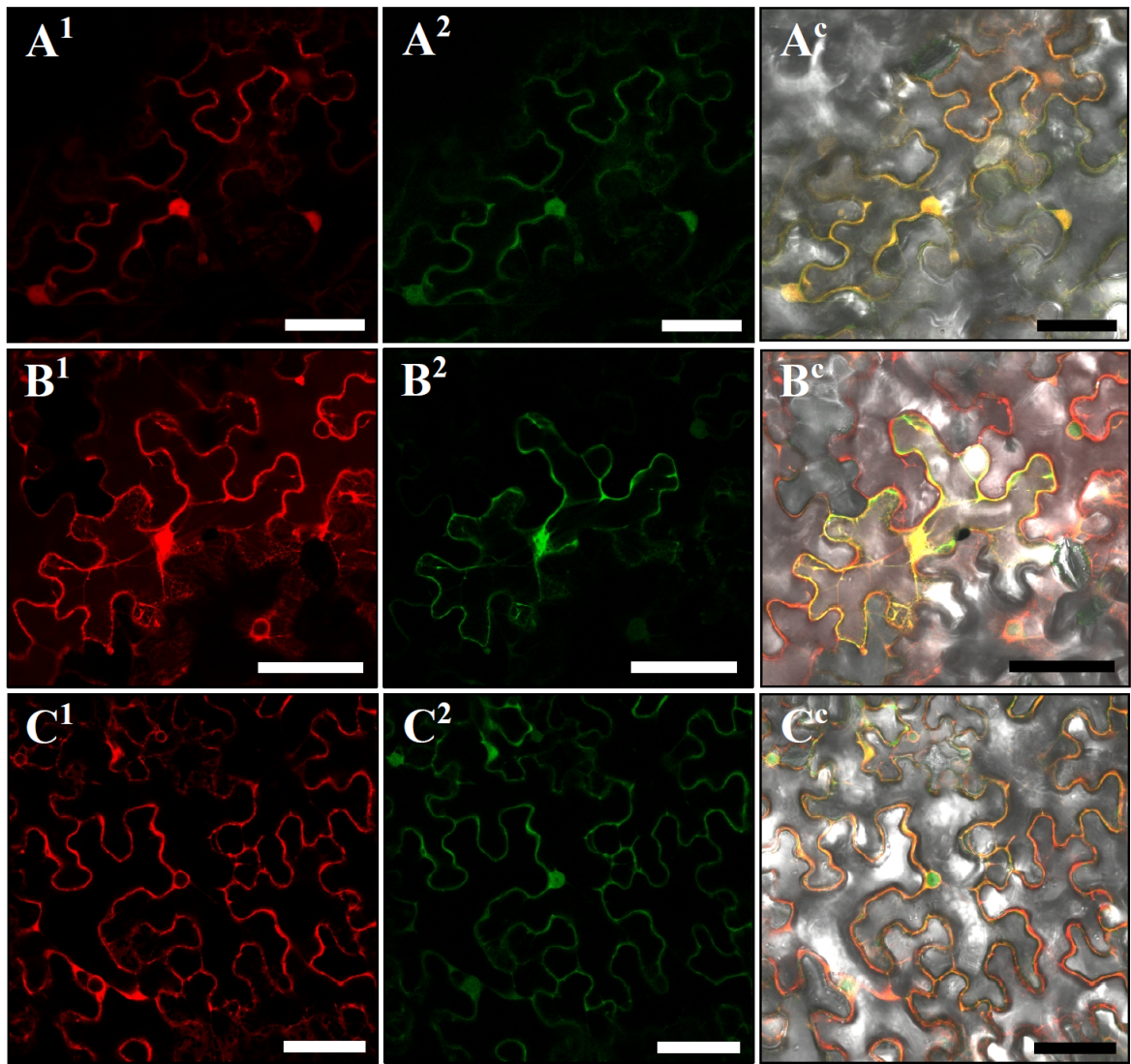
**4.17. ábra.** A *M. truncatula* *LIN2* (A) és *LIN* (B) gén promóteraktivitásának összehasonlítása kifejlett gümőkön. A promóterek *GUS* riporter gént hajtanak meg a transzformáns gyökerekben, ami  $\beta$ -glükuronidáz festés után magenta színnel látható a képeken (a szimbionták nincsenek megfestve). A római számok az érett *M. truncatula* (indeterminált) gümők működési zónáit jelölik hozzávetőlegesen (szaggatott vonalak között): I. osztódási (merisztematikus) zóna, II. infekciós zóna, II-III. interzóna (a baktériumok differenciálódása, a szimbioszómák kialakulása), III. nitrogénkötési zóna IV. szenescens (öregedési) zóna. A *LIN2* promóter erős aktivitást mutat az osztódási zónában, ami az infekciós zónában lecseng. A *LIN* promóter mindkét zónában erősen aktív. [Arányvonal: 500  $\mu$ m (A-B).]

#### 4.3.2.3. LIN2 sejten belüli lokalizációja

A *M. truncatula* LIN2 fehérje szubcelluláris lokalizációjának kísérletes vizsgálatára olyan konstrukciókat hoztunk létre, melyről azt a 35S promóterrel (*p35S*) konstitutívan meghajtva egy N-terminális EGFP molekulával fúzióban termeltethetjük. Ezeket *Agrobacterium rhizogenes* közvetített „hairy root” gyökertranszformációval juttattuk vad típusú A17 Jemalong *M. truncatula* növények genomjába. A használt vektorról szabad DsRed, mint fluoreszcens kontroll is kifejeződik, mely a citoplazmába és a sejtmagba lokalizál a transzformált sejtekben. A transzformációkat több független kísérletben megismételtük, de az EGFP::MtLIN2 fúziós fehérje jele konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal nem volt kimutatható a transzformáns gyökereken. Ezután kísérleti rendszert váltottunk, és ugyanazon konstrukciót használva, a fehérjét sikeresen, detektálható módon termeltettük *N. benthamiana* levelekben *Agrobacterium tumefaciens* közvetített tranziens transzformáció által. A fúziós fehérje és a kontroll DsRed nagy mértékű kollokalizációt mutatott a sejtek citoplazmájában és a sejtmagokban (4.18. ábra). Rendelkezésünkre álltak továbbá egyéb sejtalkotókban lokalizálódó mCherry marker konstrukciók is (Nelson et al., 2007), a LIN2 fúziós fehérjét ezekkel együtt kifejeztetve vizsgáltuk tovább annak sejten belüli elhelyezkedését. Az mCherry és a DsRed molekulák emissziós görbéje azonban nagymértékben átfed, ezért létrehoztunk egy olyan konstrukciót is, amivel a GFP6::MtLIN2 fehérje transzformációs kontroll nélkül termeltethető. Kotranszformációkat végeztünk *N. benthamiana* leveleken endoplazmatikus retikulum (ER), Golgi apparátus, illetve plazmamembrán (plazmalemma) markerekkel. Ezek közül a LIN2 erős kollokalizációt mutatott az ER kontrollal, és némileg a plazmamembrán kontrollal is (4.18. ábra), emellett az endoplazmatikus retikulumra jellemző hálózatos mintázat is megfigyelhető volt több sejten, a Golgi vezikulák jellegzetes, pöttyözött képét azonban LIN2 soha nem mutatta. Mivel a fehérje által adott jel megfigyelhető volt a citoplazmában is, ezért egyértelmű következtetéseket levonni annak plazmamembrán lokalizációját illetően nem tudtunk. Az általunk használt megközelítéssel csupán nem zártuk ki ennek lehetőségét.

*N. benthamiana* levelek tranziens transzformációjával a *M. truncatula* LIN2 fehérje sejtmagi, citoplazma (és plazmamembrán) és ER szubcelluláris lokalizációját mutattuk ki.





**4.18. ábra.** A *M. truncatula* LIN2 fehérje sejten belüli lokalizációja. Az N-terminálisán fúziós EGFP-vel jelölt LIN2 fehérjét *A. tumefaciens* közvetítette transziens levéltranszformációval különböző lokalizációs kontrollokkal termeltettük együtt *N. benthamiana* levélsejtekben. A lokalizációs kontrollok: szabad DsRed, a citoplazmába és a sejtmagba lokalizál (A), mCherry - endoplazmatikus retikulum lokalizációs marker (B), mCherry - plazmamembrán (plazmalemma) lokalizációs marker (C). <sup>1</sup>piros csatorna, a lokalizációs kontroll által kibocsájtott fluoreszcens jel; <sup>2</sup>zöld csatorna, az EGFP::MtLIN2 által kibocsájtott jel; <sup>c</sup>kombinált kép, a zöld és piros csatorna egymásra vetítve a látható fénytartomány képén (sárga szín jelöli a piros és zöld csatorna átfedő jelét). [Arányvonal: 50 µm (A), 75 µm (B-C).]

#### 4.3.2.4. *M. truncatula* LIN2 mutánsok

A *M. truncatula* inszerciós mutagenesis program (<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/index.php>) adatbázisában több a *LIN2* génben Tnt1 retrotranszpozont (Tadege et al., 2008) hordozó vonalat azonosítottunk. Ezek közül kettőt részletes elemzésre



kiválasztottunk. Az általunk *lin2-2* névre keresztelt allélt hordozó vonal Jemalong 2HA genetikai háttérben volt, s ennek magjai egy korábbi munka kapcsán azonnal a rendelkezésünkre álltak, itt a transzpozon a gén 14. és 15. exonja között, intronba épült be (4.6. ábra). Erről a szekvenciáról elméletileg a fehérje nagy része módosíthatatlanul képződhet egészen a harmadik WD40 domén végéig. Emellett, amennyiben a transzpozon jelenléte lehetővé teszi az azt hordozó *LIN2* gén teljes transzkripcióját és az mRNS megfelelő érését, a transzpozont hordozó intron kivágódása után a vad típusú fehérjével megegyező termék keletkezhet. Ennélfogva a mutánsgyűjteményből beszereztünk egy másik vonalat is. A *lin2-1* allél a retrotranszpozont a *LIN2* gén 2. exonjában hordozza (4.6. ábra) R108-as vonal genetikai háttéren. Ebben az esetben a mutáns génről csak egy csonkolt, még az U-box domént sem tartalmazó fehérje keletkezhet.

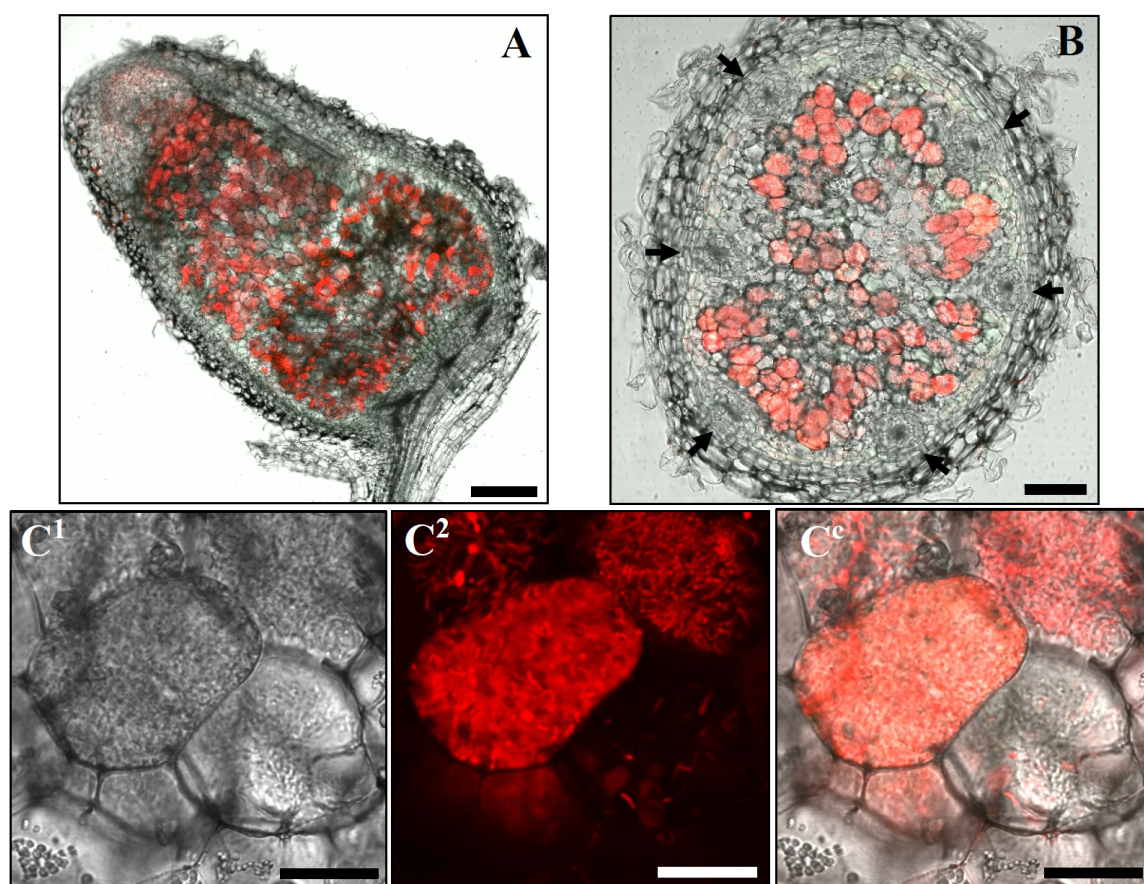


**4.20. ábra.** A *lin2* mutánsok szimbiotikus tesztjének eredménye. Egy *lin2-1* mutáns (balról) és egy vad típusú (jobbról) R108 *M. truncatula* növény *S. medicae* WSM419 inokuláció után 6 héttel (A). A *lin2-1* mutáns gyökereken (is) érett, elongált, rózsaszín gümők fejlődtek (B-C). [Arányvonal: 20 mm (A), 2000 µm (B), 1000 µm (C).]

Gümözési tesztben vizsgáltuk mind a *lin2-1*, mind a *lin2-2* vonalaknak az alléleket homozigóta módon hordozó egyedeit. Szimbionta törzsként a *S. medicae* WSM419-et használtuk. A kísérleti növények tápoldatából az inokulációt megelőző héten megvontuk a

nitrogént, későbbi növekedésük folyamán mégsem mutatták a nitrogén éhezés jeleit. Inokuláció után 6 héttel a *lin2* mutánsok a lomb és gyökérzet méretében, külalakjában hasonlóak voltak a vad típusú növényekhez, a gyökereken érett, rózsaszín, elongált gümők voltak megfigyelhetők mind a *lin2-1*, mind a *lin2-2* egyedeken (4.20. ábra).

A gümők infekcióját mRFP-t termelő *S. medicae* WSM419 törzzsel inokulált növényeken vizsgáltuk. A kifejlett gümők felépítése a vad típusúaknak megfelelő volt, a gümőkben perifériás elhelyezkedésű szállítónyalábok voltak megfigyelhetők, a baktériumok megfelelően fertőzték a gümősejteket (4.21. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a *LIN2* gén nem nélkülözhetetlen a funkcionális nitrogénkötő endoszimbiózis kialakításához.



**4.21. ábra.** *lin2-1* mutáns gümők hosszszetszeti (A) és keresztmetszeti (B) képe *S. medicae* WSM419 inokuláció után 6 héttel. A szimbionta mRFP fluoreszcens fehérjét termel (piros színnel látszik a képeken). Fekete nyilak jelölik a gümő perifériás elhelyezkedésű szállítónyalábjait (B). A szimbiotikus infekció normális, a gümősejteket kitöltik a baktériumok (C). <sup>1</sup>a látható fénytartomány képe; <sup>2</sup>piros csatorna, az mRFP által kibocsájtott jel; A, B és C<sup>c</sup> kombinált kép, a piros csatorna a látható fénytartomány képére vetítve. [Arányvonal: 200 µm (A), 100 µm (B), 25 µm (C).]

## 5. AZ EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA

### 5.1. *Medicago truncatula* szimbiotikus gének feltételezett ortológjai zárvatermő növényekben

A világszerte folyó kutatások eredményeképp a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nélkülözhetetlen gének, géntermékek közül egyre többet ismerünk. Az egyre olcsóbb és gyorsabb szekvenálási technikáknak köszönhetően pedig mind több és több növényfaj teljes genomszekvenciája elérhetővé válik a publikus szekvencia adatbázisokban. Vizsgálatunkban *M. truncatula* szimbiotikus fehérjék, és a nitrogénkötő szimbiózisban ismert szereppel nem rendelkező fehérjék - mint kontrollok - szekvenciájával végeztünk kereséseket kiválasztott teljes zárvatermő növényi genomszekvenciákban. A kiválasztott szimbiotikus szekvenciák közül a DMI1, DMI2, DMI3 és IPD3 fehérjék a nitrogénkötő és mikorrhiza szimbiózis kialakításához egyaránt nélkülözhetetlen közös szimbiotikus útvonal (CSP) elemei. A többi fehérje nitrogénkötő szimbiózis specifikus. Közülük az NFP és LYK3 fehérjék a CSP aktiválásához szükségesek, míg az *NSP1*, *NSP2*, *ERN1*, *NIN*, *CRE1*, *LIN*, *RIT* és *PIR1* gének a CSP-től downstream (génhierarchiában a CSP tagjainak alárendelve), vagy azzal párhuzamos útvonal(ak)on működnek a szimbiotikus gümőképződés, illetve infekció folyamán a nitrogénkötő szimbiózis kialakításában (Madsen et al., 2010). A *SUNN* és *KLV* gének a gümőszám autoregulációjában vesznek részt. A kiválasztott kontroll szekvenciák közül az *RBCL*, *ATPB* és *MATK* kloroplaszt genomban kódolt, rendszertani munkákban elterjedten alkalmazott marker gének, a többi szekvencia sejtmagi kódolású. A *MAG1*, *AGT1*, *DH*, *EIF3K*, *ATPQ*, *TAFIII5*, *ATP7* és *RRMP* gének kölcsönösen egy kópiában azonosított szekvenciák az *A. thaliana*, a *P. trichocarpa*, a *V. vinifera* és az *O. sativa* genomban is, a *G6PDH* szekvencia egy általános háztartási gén. A kereséseket 8 kétszikű (Dicotidae: *Pisum sativum*, *Lotus japonicus*, *Cucumis sativus*, *Populus trichocarpa*, *Carica papaya*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* és *Solanum lycopersicum*), illetve 2 egyszikű (Liliopsida: *Oryza sativa* és *Zea mays*) faj elérhető szekvenciái között végeztük. A *P. sativum* és *L. japonicus* pillangósvirágú (Fabales) fajok képesek nitrogénkötő szimbiózis kialakítására is, a többi faj csak mikorrhiza szimbiózisra képes lépni. Az *A. thaliana* e két növény-mikroba szimbiózis közül egyiket sem képes kialakítani. A keresések során célunk a referenciaként választott *M. truncatula* szekvenciákhoz a leghasonlóbb homológ szekvencia azonosítása volt minden kiválasztott genomból. Ezeket feltételezett ortológokként kezeltük. A valós ortológ viszony megállapításához további (pl. szinténia,

génszerkezet, funkcionális) vizsgálatok lennének szükségesek, azokat itt nem végeztük el. Az általunk alkalmazott kereső és szűrő módszer nagy valószínűséggel ortológ szekvenciákat választott ki. Két géntermék hasonló egymáshoz, ha közös az eredetük, vagyis egy ős gén leszármazottai (ortológok vagy paralógok), vagy ha konvergens szekvencia evolúció formálta azokat hasonlóvá. Tekintve azonban, hogy a nitrogénkötő szimbiózis kialakításában részt vevő gének homológjait zömmel nem gümöző fajok genomjából kutattuk fel, nem valószínű, hogy ezekre a fehérjékre a gümöző fajok kópiáival azonos szelekciós erők hatottak volna. A vizsgált gümöző fajokból gyűjtött kópiák esetén pedig a szekvencia egyezések magas foka miatt erősen valószínűsíthető volt a fennálló ortológ viszony. Problémát a paralóg szekvenciák jelentettek, azok is olyan esetekben, amikor az adott *M. truncatula* kereső szekvenciának nem létezett ortológja a vizsgált genomban. Ezeket a paralógokat reciprok BLAST keresésekkel szűrtük ki (lásd 4.1.3. fejezet), és csak néhányat találtunk, ezek mindegyike a szimbiotikus csoportból került ki. A kiválasztott szekvenciák előzetes analízise során végzett reciprok BLAST vizsgálat az egyszikűek LYK3 homológ találatairól, és több *A. thaliana* találatról bizonyította, hogy nem ortológjai a *M. truncatula* kereső fehérjének. A *M. truncatula* LYK3 szekvencia a LysM domént tartalmazó receptor kinázok családjához tartozik, mely jelentős expánzió ment keresztül a pillangósvirágúakban: *M. truncatula*-ban és *L. japonicus*-ban 26 illetve 21 tagot számlál (Arrighi et al., 2006; Lohmann et al., 2010; Bozsoki et al., 2017). A család *A. thaliana*-ban 7, míg *O. sativa*-ban 9 taggal szerepel (Shiu et al., 2004; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009). A pillangósvirágúak nitrogénkötő szimbiózisban szerepet játszó LYK3 ortológ kópiája valószínűleg csak az egyszikű és kétszikű fejlődési vonalak elválása után jelent meg a növények törzsfejlődése során. Ugyanakkor a vizsgálatba bevont másik LysM domént tartalmazó receptor kináz, az NFP, egyszikű genomokban fellelhető leghasonlóbb homológjai reciprok BLAST keresések után is feltételezett ortológok maradtak. A vizsgált egyszikű fajok képesek mikorrhiza szimbiózis kialakítására, sőt bizonyos esetekben laza asszociatív kapcsolatra is nitrogénkötő baktériumokkal. (Sandhiya et al., 2005) A legtöbb ortológ kópia az általános modellnövény, az *A. thaliana*, genomjából hiányzott, mely sem nitrogénkötő, sem mikorrhiza szimbiózis kialakítására nem képes. Vélhetően ez utóbbi képességet törzsfejlődése során elveszítette. Ha egy szignalizációs útvonal egy adott eleme működésképtelenné válik, és ezáltal az egész útvonal használhatatlan lesz, az útvonal integritását megtartó szelekciós erők többé már nem konzerválják annak egyéb tagjait sem. A funkciójukat veszített egyéb elemek is gyorsan áldozatul válnak a bennük felhalmozódó, és működésüket tönkre tévő mutációknak, delécióknak. Ennek megfelelően nem csak a nitrogénkötő szimbiózis elemei, de a mikorrhiza szimbiózishoz is nélkülözhetetlen közös szimbiotikus gének ortológjainak többsége is hiányzik az *A. thaliana* genomjából, vagy mára felismerhetetlenné vált. Amely ortológok pedig

felismerhetően jelen vannak, azok az *A. thaliana*-hoz hasonlóan szintén keresztesvirágú (Brassicales), de mikorrhiza szimbiózis kialakítására képes *C. papaya* géntermékekhez képest minden esetben gyengébben hasonlítanak a megfelelő *M. truncatula* fehérjéhez. Ezek a géntermékek feltehetőleg egyéb fontos, nem szimbiotikus funkcióval rendelkeznek (amit adott esetben nem redundáns módon látnak el), így megmaradásuk az *A. thaliana* genomban szükségszerű volt.

Az összegyűjtött leghasonlóbb szekvenciák hosszát egyenként összevetettük a megfelelő *M. truncatula* fehérje hosszával annak eldöntésére, hogy történtek-e nagyobb, akár teljes doméne(ke)t érintő változások bizonyos fehérjék fejlődése során. Jelentősebb hosszbeli eltérést csupán néhány szimbiotikus homológ esetén tapasztaltunk. A referenciaként használt *M. truncatula* szekvenciához képest több mint 20%-os eltérést mutattak az egyszikű DMI2 ortológok. Ez a hosszkülönbség már utalhat a fehérjék doménösszetételében megjelenő eltérésekre. Markmann et al. (2008) munkája alapján tudjuk, hogy a DMI2 ortológok a növények evolúciója folyamán extracelluláris doméneket szereztek, úgy fejlődtek. Az így keletkezett *Datisca glomerata* (Cucurbitales, nitrogénkötő aktinorhiza szimbiózis kialakítására képes), és a *Tropaeolum majus* (Brassicales, nem gümöző növény) hosszabb szekvenciát funkcionális szimbiotikus tesztekben is vizsgálták, és kiderült, hogy megfelelő kifejeztetés mellett képesek voltak menekíteni a *L. japonicus* DMI2 ortológ *symrk* mutáns növények fenotípusát. Ezzel ellentétben a rövidebb, hiányos extracelluláris domént hordozó egyszikű *O. sativa* homológ szekvencia csupán a *L. japonicus* SYMRK/DMI2 fehérje mikorrhiza szimbiózisban betöltött működését volt képes ellátni, a funkcionális nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nem működött megfelelően. Az egyszikűek NSP2 homológjai, és a *Z. mays* ERN1 szekvenciája mutatott még 10-15%-os hosszeltérést az adott referenciához képest. InterPro doménkeresésekkel azonban nem tudtunk extra doméneket kimutatni ezekben a fehérjékben. Az *O. sativa* NSP2 szekvenciával, *L. japonicus* *nsp2* mutánsokon Yokota et al. (2010) végzett menekítési kísérleteket. Ezekben a szekvencia hossz eltérés nem okozott problémát, az egyszikűből származó transzgen teljes mértékben komplementálta a pillangósvirágú növény szimbiotikus fenotípust mutató mutációját.

#### **5.1.1. A szimbiotikus gének fejlődésében felismert evolúciós trendek és funkcionális vonatkozásaik**

Miután meghatároztuk, hogy a homológ fehérjék többsége hosszban minden fennakadás nélkül illeszthető, a kiválasztott feltételezett ortológ szekvenciákat egyenként páronkénti



illesztésben hasonlítottuk össze a megfelelő *M. truncatula* referencia fehérjével. Az egyes illesztési pozíciókban kapott megegyező aminosavak százalékos aránya az ún. ID érték, ezt használtuk a géntermékek további elemzésében. Az egyes géntermékek ID adatait a vizsgálatba vont fajoknak a referencia *M. truncatula*-tól számított rendszertani távolsága szerint rendeztük sorba. Balról jobbra haladva egyre távolabbi rokonságban lévő fajok értékei kerültek a 4.3. táblázatba. Amikor az egyes ID értékeket géntermékenként követjük a fajok során át: két alkalommal tapasztalhatunk jelentősebb változást, ugrásszerű csökkenést az adatokban. Az első a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajok és az egyéb, erre nem képes kétszikűek között, a második a kétszikű és egyszikű fajok értékei között jelentkezik (4.4. ábra grafikonjai). Az ID értékekben tapasztalható hirtelen csökkenés oka lehet az adott géntermék növényi evolúció folyamán mutatott általánosan gyors változása. A gyorsan változó (gyengén konzervált) szekvenciák távolabbi rokon fajok között kifejezettebb különbséget mutatnak, mint a növényi evolúció folyamán lassan változó szekvenciák. A változás sebességére a legnagyobb rendszertani ugrás helyén, adatainkban a kétszikűek - egyszikűek határán következtethetünk legjobban. Emellett az ID különbség okai lehetnek a géntermékeket formáló fajokként, fajcsoportonként eltérő evolúciós erők is. Esetünkben ez a nitrogénkötő szimbiózis kialakításának képességéből/hiányából adódik, melynek nyomait a pillangósvirágú növények és az egyéb kétszikűek közti adatok között találhatjuk.

A vizsgált gümöző és a legközelebbi rokon nem gümöző (*M. truncatula* és *L. japonicus*, valamint a szintén Eurosidae I. kládba tartozó *C. sativus* és *P. trichocarpa*) fajok közötti rendszertani ugrás viszonylag kicsi, ennek hatása megfigyelhető a kontroll génekre kapott értékek többségén is (A' kategória). Éppen ezért a szimbiotikus génekre kapott ID értékekben bekövetkező jelentős változás nagyobb valószínűséggel a nitrogénkötő szimbiózis képességének megjelenésével hozható kapcsolatba, semmint a géntermék gyors evolúciójával, de ilyen következtetések levonásához minden esetben meg kell bizonyosodnunk a kétszikűek - egyszikűek közti eltérések nagyságáról is. Ez utóbbi esetben, a nem gümöző kétszikű fajokat követően (a *S. lycopersicum* és *O. sativa* között), egy jelentős rendszertani ugrás után láthatjuk az egyszikű fajok értékeit. Itt két olyan csoport nem gümöző fajainak értékei között figyelhetjük meg a változást, ahol a nitrogénkötő szimbiózist formáló szelekciós erők valószínűleg nem hatottak. A kétszikű és egyszikű fajok között mért ID érték változás mértéke közvetlenül utalhat tehát az adott géntermék evolúciójának sebességére. Ha nagy ez a változás, akkor gyors, ha kicsi a változás, akkor lassú az adott géntermék szekvencia evolúciója. Minden egyes géntermékre megvizsgáltuk az egyes fajcsoportok közötti ID érték változásokra jellemző mintázatot, melynek eredményeképp az egyes fehérjéket három csoportba soroltuk (A, B, C a szimbiotikus és A', B', C' a kontroll fehérje csoportnál, lásd 4.1.5. fejezet).

Abban az esetben, amikor a gümöző és nem gümöző kétszikű fajok között, valamint a kétszikű és egyszikű fajok között is enyhe az ID értékek változása (4.4. ábra, A és A' kategória), akkor valószínű, hogy az adott géntermék lassan változott a zárva termő növények evolúciója során, szekvenciája jól konzervált. Emellett, mivel szekvenciája a gümöző fajokban sem változott meg lényegesen más kétszikűekhez viszonyítva, feltételezhető, hogy nem volt szükség kiterjedt szekvencia változásokra ahhoz, hogy a nitrogénkötő szimbiózis során végzett működését képes legyen elvégezni. Ez arra utalhat, hogy az A kategóriába sorolt pillangósvirágú szimbiotikus szekvenciák nem gümöző fajokból vett ortológjai megfelelő kifejeztetés mellett nagy eséllyel képesek a gümöző növényekben működő ortológjuk szimbiózis során végzett működését betölteni. Ezt látszanak alátámasztani a szakirodalomban elérhető komplementációs kísérletek eredményei is (lásd a Mellékletek fejezet 10.2. táblázatát). A *L. japonicus DMI3* ortológ génben hibás *ccamk* mutáns növényeket az egyszikű *O. sativa DMI3* ortológ szekvencia teljes mértékben komplementálta (Banba et al., 2008). Megjegyzendő azonban, hogy ugyanez a szekvencia natív *M. truncatula DMI3* promóterről hajtva is csak részlegesen volt képes menekíteni a *M. truncatula dmi3* mutánsokat (Godfroy et al., 2006). Érdekes módon a *M. truncatula rit* mutánsokat teljes mértékben képes volt komplementálni a szimbiózist kialakítani nem képes *A. thaliana*-ból vett ortológ (Miyahara et al., 2010). Ez újra azt a feltételezést erősíti, hogy a génterméknek a szimbiózis során végzett működése nem kíván egy új, csak a szimbiózisra specifikus funkciót.

Azok a szekvenciák, amelyek jelentős ID érték csökkenést mutattak a gümöző és nem gümöző kétszikű fajok között, azonban az értékeik nem változtak számottevően a kétszikűek és egyszikűek között (4.4. ábra, B és B' kategória), feltételezhetően olyan géntermékek, amelyekre általánosságban nem jellemzőek a gyors evolúciós változások, de jelentős szekvencia eltérések jelentek meg a gümöző fajokban. Feltételezhető ez alapján, hogy a bekövetkezett szekvencia változások legalább részben a fehérjék nitrogénkötő szimbiózisban végzett működéséhez szükségesek, s ha ez igaz, ezeknek a nem-gümöző növényekből származó ortológjai kis valószínűséggel képesek elvégezni pillangósvirágúak szimbiotikus működését. Például az *O. sativa DMI1* ortológ, a konstitutív kifejeződést biztosító karfiol mozaik vírus 35S promóteréről meghajtva, csak részben volt képes komplementálni a *M. truncatula dmi1* mutáns növényeket (Chen et al., 2009). Ugyanez a szekvencia hasonló módon csak részben menekítette az ortológ génben mutáns *L. japonicus pollux* növényeket, akár a 35S promóterrel, akár a *L. japonicus POLLUX* promóterével biztosították a transzgén kifejeződését (Banba et al., 2008). A *DMI2* ortológban mutáns *L. japonicus symrk* növényeket az *O. sativa DMI2* ortológ gyengén és részben, a *S. lycopersicum* ortológ pedig egyáltalán nem volt képes komplementálni, ez a két homológ fehérje hiányos extracelluláris doméneket hordoz. Mindkét esetben a *L. japonicus*

*SYMRK* promótert használták a kifejeződést szabályozó elemként. Érdekes kivétel azonban a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajokkal viszonylag közeli rokonságban álló, de nem gümöző keresztesvirágú (Brassicales) faj, a *T. majus*. *DMI2* ortológja teljes mértékben menekítette a *L. japonicus symrk* mutánsokat (Markmann et al., 2008). Ez a Brassicales faj nem szerepelt az összehasonlító táblázatunkban. *DMI2* ortológja a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajok kópiáihoz hasonlóan teljes extracelluláris doménnel rendelkezik, ami a *M. truncatula* fehérjével illesztve 59% ID és 73% *SIM* értékeket mutat. A szintén **B** kategóriába sorolt *NIN* gén *O. sativa* ortológja a *L. japonicus NIN* promóter szekvenciájával meghajtva egyáltalán nem volt képes komplementálni a *L. japonicus nin* mutánsokat (Yokota et al., 2010).

A mindkét vizsgált fajcsoport határon jelentékeny ID érték esést mutató szekvenciák (4.4. ábra, **C** és **C'**) feltételezhetően gyorsan változtak a növényi evolúció folyamán. Ha emellett megtartották az eredeti funkciójukat, akkor valószínűleg jelentős szekvencia flexibilitás jellemzi őket. Flexibilitásuk révén könnyen változhattak, és változásuk eredményeképp akár új működéseket is képesek lehettek elvégezni. Ilyen funkció lehetett a gümöző fajokban lévő kópiák nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepe. Ez alapján tehát a **C** kategória elemeinél két lehetőséget is figyelembe kell vennünk: 1) vagy a **B** kategória tagjaihoz hasonlatosan, a szekvencia evolúciójuk folyamán a nitrogénkötő szimbiózisra specifikus működésekre váltak képessé, vagy 2) a változás inkább a gyors evolúciós sebesség következménye, mely nem eredményezett a szimbiózis szempontjából specifikus változást. A **C** kategória tagjaival végzett komplementációs tesztek azonban eddig kivétel nélkül az utóbbi eshetőséget erősítik, vagyis pozitívnak bizonyultak. Az *IPD3* ortológ *L. japonicus cyclops* mutáns növényeket a *L. japonicus CYCLOPS* promóterrel kifejeztetett *O. sativa IPD3* ortológ teljes mértékben menekítette (Yano et al., 2008). A *Nicotiana benthamiana* (Solanales) *NSP1* ortológ kódoló szekvenciája (59/74% ID/*SIM* a *M. truncatula NSP1*-gyel összevetve) *M. truncatula NSP1* promóterrel hajtva gyengén, de komplementálta a *M. truncatula nsp1* mutánsokat, és erősebb hatékonysággal menekítette a *L. japonicus nsp1* mutációt is (Heckmann et al., 2006). Az *O. sativa NSP1* és *NSP2* ortológok genomi szekvenciája pedig teljes mértékben menekítette a *L. japonicus nsp1* és *nsp2* mutánsokat (Yokota et al., 2010).

A felállított evolúciós kategóriák megtalálhatóak mind a szimbiotikus (**A**, **B**, **C**), mind a bizonyított szimbiotikus funkcióval nem rendelkező kontroll (**A'**, **B'**, **C'**) szekvenciák között. Az egyes kategóriák elemszáma azonban nagy mértékben eltér a két csoportban. A kontroll szekvenciák zöme a lassan változó, jól konzervált szekvenciák közé volt sorolható. A kivételek egyike a *MATK*, amely egy bizonyítottan gyorsan változó gén (Barthet and Hilu, 2008), besorolásunk alapján is a **C'** csoportba került. A kontrollokkal szemben a szimbiotikus szekvenciák inkább a **B** vagy a **C** kategóriákba sorolhatók. Ez utalhat arra, hogy a szimbiotikus



szekvenciáknak specifikus változásokon kellett átessenek, hogy a szimbiózisban végzett működésüket megvalósíthassák, illetve utalhat arra, hogy a gyors szekvencia evolúciót mutató géntermékek preferenciálisan verbuválódtak a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges gének sorába.

#### **5.1.1.1. Vajon tetten érhető, netán megjósolható a kapcsolat egy fehérje felismerhető változásai és a szimbiózisban betöltött funkciója között?**

Az eddigi tapasztalatok alapján a rövid válasz, hogy van ahol igen (pl. **B** kategória elemei), és van ahol nem (pl. **C** kategória elemei). Az általunk kijelölt szimbiotikus kategóriák a géntermékek, és funkciójuk változatos volta, és szekvencia evolúciójuk eltérő sebessége miatt csak korlátozott mértékben általánosíthatóak. További genomok bevonásával, a szárazföldi növények törzsfájának jobb, és egyenletesebb telítésével, illetve valamennyi szimbiotikus géntermék esetén legalább egy, pl. egyszikű fajból vett ortológ szekvenciával, szimbiotikus mutánsokon végzett komplementációs teszt elvégzésével a módszer megbízhatósága tovább növelhető, de úgy sem helyettesítheti a részletekbe menő domén összetétel és szekvencia analízist. Vizsgálataink rávilágítanak azonban arra, hogy a gümöző növényekben a nitrogénkötő szimbiózis folyamán működő gének/géntermékek különbözőképpen verbuválódtak a szimbiotikus nitrogénkötéshez nélkülözhetetlen szekvenciák közé. Egyesek új működésekre tettek szert a nitrogénkötő fajokban, míg másoknak a nem gümöző fajokban végzett működése vált létfontosságúvá a nitrogénkötő szimbiózisban. Ez utóbbi történhetett jól konzervált szekvenciával, de egyes géntermékek jelentős szekvencia flexibilitás mellett képesek voltak megtartani eredeti funkciójukat. Vizsgálatunk kiemeli azt is, hogy a nem gümöző növényekből vett szekvenciák közül nemcsak a jól konzerváltak lehetnek képesek ortológjaik nitrogénkötő szimbiózisban végzett működését véghez vinni. A szimbiotikus nitrogénkötésre képes fajokkal távoli rokonságban álló, nem gümöző fajokból származó, a nitrogénkötő fajokban működő géntermékekkel gyenge hasonlóságot mutató szekvenciák is képesek lehetnek elvégezni ortológjaiknak a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nélkülözhetetlen működését. Az evolúció folyamán azonban, a kódoló szekvenciák mellett, változások történhettek az egyes gének szabályozásában is. A kódoló szakaszok után az egyes gének szabályozó régióinak evolúciós (bioinformatikai és kísérletes funkcionális) vizsgálata további adatokkal szolgálhat számunkra a jövőben, hogy megérthessük, miként, milyen változások révén került egy-egy gén/géntermék a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges szekvenciák sorába.

## 5.2. *LIN* homológok evolúciós és funkcionális elemzése

A *M. truncatula* *LIN* gén egy, a nitrogénkötő endoszimbiózis kialakításában nélkülözhetetlen szerepet játszó E3 ubikvitin ligáz fehérjét kódol (Kiss et al., 2009). Doménfelépítése egyedi jelleggel bír, tartalmaz egy U-box és egy Armadillo domént, valamint több WD40 domént. Az U-box és Armadillo domének együttes jelenléte egy csak a növényekre jellemző kombináció, az ilyen felépítésű fehérjék jellemzően E3 ubikvitin ligázok (Samuel et al., 2006). Az ilyen doménösszetételű fehérjék között is csak a *LIN* volt az, amelyik még emellett WD40 doméneket is hordoz a fehérje C-terminális végén, és egy ismeretlen funkciójú, egyedi, *LIN* specifikus domént (*LIN* domén) az N-terminális végen (Kiss et al., 2009).

Amikor a *LIN* fehérje aminosav szekvenciájával szekvencia adatbázisokban kereséseket végeztünk, nem csak a *LIN* gén ortológjait kaptuk találatként, de egy azokhoz igen hasonló paralóg *M. truncatula* szekvencia, és annak ortológjai is az eredmények között szerepeltek. Ezen paralóg géncsalád tagjait *LIN2*-nek neveztük el. A *LIN* és *LIN2* gének és általuk kódolt fehérjék evolúciós kapcsolatának felderítésére, és funkciójuk mind teljesebb leírására bioinformatikai és kísérletes biológiai vizsgálatokat is végeztünk.

### 5.2.1. A *LIN* géncsalád feltárt evolúciós viszonyai

A speciális domén-összetételű fehérjét kódoló *LIN* homológok kizárólag növényi genomokban találhatók meg. A szárazföldi növényeket jól reprezentáló szekvenált genomokból adatbázis keresésekkel összegyűjtöttük az elérhető *LIN* és *LIN2* szekvenciákat, és részletesen elemeztük ezeket. A vizsgált kétszikűekben jellemzően egy-egy *LIN* és egy *LIN2* ortológot találtunk. Ez alól a *P. trichocarpa* és az *A. thaliana* kivétel. A *P. trichocarpa* genom egy *LIN2* kópia mellett kettő *LIN* ortológot hordoz. Egy, a közelmúltban történt, a genom mintegy 92%-át érintő duplikációs eseménynek köszönhetően a *P. trichocarpa* genomban mintegy 8000 hasonló korú paralóg gén pár található (Tuskan et al., 2006), ezek egyike a két *LIN* kópia is. Érdekes módon *LIN2* vagy nem duplikálódott, vagy a duplikáció óta törlődött a *P. trichocarpa* genomból. Mivel a *LIN2* környezetében lévő szekvenciák (melyeket a géneket körülvevő nagyobb genomi szakaszok összehasonlításánál használtunk, 4.10 ábra) sem utaltak duplikált régióra, az első lehetőség a valószínűbb. A kompakt *A. thaliana* genom egyetlen *LIN* homológot sem hordoz (bővebben lásd 5.1. és 5.2.3. fejezet). A 4.9. ábrán bemutatott filogenetikai fát alkotó szekvenciákon túl, a *LIN* és *LIN2* gén egy-egy kópiában megtalálható még a boglárkavirágúak (*Ranunculales*) közé sorolt *Aquilegia coerulea* genomjában is. A zárvatermő növények

filogenetikai fáján a boglárkavirágúak alkotják a legbazálisabb helyzetű valódi kétszikű (Eudicotidae) kládot, vagyis ez a csoport vált el legkorábban a többi valódi kétszikű fejlődési vonalától. Ha mind a *LIN*, mind a *LIN2* gén ortológjai jelen vannak a boglárkavirágúak és más kétszikűek fejlődési vonalán is, akkor ez azt jelenti, hogy ott kellett lenniük a valódi kétszikűek közös ősében is, mintegy 120 millió évvel ezelőtt (Magallón and Sanderson, 2005), jóval a nitrogénkötő szimbiózis kialakulását megelőzően. Továbbá a valódi kétszikűek közül a boglárkafélék közös ősének genomja hasonlít legjobban az egy- és kétszikűek közös ősének genomjához. A vizsgált egyszikűekben azonban csupán egy *LIN* homológot találtunk, melyek a filogenetikai és szinténia analízis alapján *LIN2* ortológnak bizonyultak.

A Lycopodiophyta csoporthoz tartozó *S. moellendorffii* csipkeharaszt genom két *LIN* homológot kódol. A többi szekvenált szárazföldi növényvel ellentétben ebben a genomban nincsen nyoma ősi teljes genom duplikációnak, vagy poliploidának (Banks et al., 2011), emellett a két géntermék hasonlósága összevethető más fajok *LIN*-*LIN2* ortológ fehérje párosainak hasonlóságával. Valószínű tehát, hogy a *S. moellendorffii* *LIN* homológok a kétszikűekben megtalált *LIN* és *LIN2* gén egy-egy ortológja. Ebben az esetben a *LIN* és *LIN2* gén már jelen volt a Lycopodiophyta és a kétszikűek irányába vezető leszármazási vonalak közös ősében is, vagyis a magasabbrendű növények (Tracheophyta) közös ősének genomjában. A Lycopodiophyta csoport mintegy 400 millió évvel ezelőtt vált le a szárazföldi növények fő fejlődési vonaláról (Stewart, 1993), vagyis a *LIN*-*LIN2* duplikációs eseménynek ezt megelőzően kellett történnie. Egyáltalán nem találtunk azonban *LIN* homológot a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga, a *Volvox carteri* telepes zöldalga, és a *Physcomitrella patens* moha elérhető genomszekvenciájában sem. A rendelkezésre álló információk alapján az ősi *LIN* gén megjelenése a magasabbrendű növények megjelenésének idején történhetett, majd rövid időn belül duplikálódott. A *LIN* és a *LIN2* gén azóta is párhuzamosan jelen van számos növényi leszármazási vonalban. Feltételezzük, hogy az egy- és kétszikű fejlődési vonalak különválása után a kétszikűeknél megmaradt mind a két génkópia, míg az egyszikű vonal vagy nagyon korán elveszítette a *LIN* ortológ kópiát és így bennük már ez nem található meg (bár ennek igazolására további szekvenált egyszikű genomi adatra lenne szükség), vagy bizonyos egyszikű vonalak vesztették el azt. Elképzelhető, hogy az ősi *LIN* gén a magasabbrendű növényekre jellemző valódi szövetek megjelenése, illetve az összetettebb testfelépítés kialakulása során jött létre, így funkciója is ide kapcsolható.

### 5.2.2. A LIN fehérjék funkciója

A LIN és a LIN2 fehérje is doménfelépítése alapján egy feltételezett E3 ubikvitin ligáz. A már fentebb ismertetett domének közül az U-box domén felelős az ubikvitin ligáz aktivitásért. Ezáltal az ubikvitinált szubsztrát fehérjét proteolitikus lebontásra ítélné, de akár allosztérikusan stabilizálhatja és aktiválhatja is, alternatív módon poliubikvitinációval kötőhelyeket alakíthat ki a szubsztráton, melyhez ubikvitin kötő doménnel rendelkező partnerek kapcsolódhatnak (Komander, 2009). Az Armadillo és WD40 domének fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában vehetnek részt, melyek LIN és LIN2 szubsztrátspecifitásának meghatározásán túl, akár fehérje komplexek kialakításában is részt vehetnek. Egy E3 ligáz számos szubsztrátot is felismerhet (Zhuang et al., 2013), így több, egymástól akár független folyamatban, több funkciót is betölthet.

Mutáns fenotípusa alapján eddig csak a pillangósvirágúakban megtalálható *LIN* kópiáról tudjuk, hogy fontos szerepet tölt be a nitrogénkötő szimbiotikus folyamat során. Ugyanakkor kifejeződési vizsgálatok alapján a LIN-nek is szerepe lehet akár más, a gyökérben zajló folyamatokban is (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). Jelen munkában az újonnan azonosított paralóg MtLIN2 funkciójához kapcsolódó vizsgálatokat végeztünk, valamint más növényekből származó LIN homológokat teszteltünk, hogy vajon képesek-e ellátni a kiesett szimbiotikus funkciót a *M. truncatula lin* mutánsban. Feltételeztük, hogy ezek funkciójának feltárásával közelebb jutunk a LIN fehérje esetleges nem szimbiotikus szerepének megértéséhez, és képet alkothatunk arról, hogy a növényi evolúció folyamán miképpen verbuválódhatott *LIN* a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nélkülözhetetlen gének sorába.

#### 5.2.2.1. A *M. truncatula* LIN2 gén kifejeződése és a fehérje lokalizációja

Egy géntermék adott helyen és időben betöltött funkcióját nemcsak szekvenciája, de kifejeződési mintázata is meghatározza. A *M. truncatula* LIN2 fehérjét fluoreszcens jelölő fehérjével fúzióban termeltetve igyekeztünk annak sejten belüli lokalizációját vizsgálni. *M. truncatula* transzformáns gyökereken azonban nem hoztak eredményt a fehérje kimutatására irányuló kísérleteink. A fúziós fehérjék fluoreszcens jele nem volt detektálható, annak ellenére, hogy azt az általános kifejeződést biztosító 35S promóterről meghajtva termeltettük. Ugyanakkor *N. benthamiana* levélen, heterológ rendszerben végzett lokalizációs vizsgálatokkal a *M. truncatula* LIN2 fehérjét kimutattuk a sejtmagban, az endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában is. Tekintve, hogy a fehérje jelen van a citoplazmában, egyértelmű

következtetéseket levonni annak plazmamembránhoz, vagy tonoplaszthoz kapcsolt lokalizációját illetően nem tudtunk. Az általunk használt megközelítéssel, tekintve a sejtek nagy részét kitöltő vakuolumot, csupán nem zártuk ki ezek lehetőségét. A LIN2 fehérje nem tartalmaz transzmembrán domént, de az Armadillo és WD40 domének által potenciálisan kötődhet akár membrán-, vagy membrán asszociált fehérjékhez is. A LIN2 fehérje tömege 149 kDa. Ilyen méretű molekulák már csak aktív transzporttal juthatnak át a sejtmag membrán pórusain, de az *in silico* vizsgálatok nem prediktáltak magi lokalizációs szignált LIN2 szekvenciáján. Az egér  $\beta$ -katenin például a specifikus Armadillo ismétlődések segítségével jut keresztül a sejtmagi pórus komplexeken. Ezek az Armadillo szekvenciák közvetlenül képesek kapcsolódni bizonyos nukleoporinok FG ismétlődéseihez (a dokkoló helyhez) akkor is, ha a  $\beta$ -katenin éppen egy kölcsönható partneréhez is kapcsolódik, ami szintén az Armadillo doménen történik (Sharma et al., 2012). Elképzelhető, hogy a LIN2 fehérje hasonló módon jut be a sejtmagba, akár más fehérjéket is magával szállítva.

A LIN2 gén kifejeződésének *M. truncatula* gyökérben és gümőben történő vizsgálatához klónoztuk az első kódoló tripletet közvetlenül megelőző 2156 bp-t. A gén térbeli és időbeli expressziós mintázatának feltérképezése során ezt a szekvenciát használtuk *M. truncatula* LIN2 promóterként (-2156 *pMtLIN2*). A LIN2 promóter erős aktivitást mutatott az oldalgyökér kezdeményekben a korai sejtosztódásoktól egészen a kifejlett állapotig, és hasonló módon volt nyomon követhető a gümőfejlődés teljes folyamatán keresztül. Ez az aktivitás később fokozatosan a merisztematikus sejteket tartalmazó területekre húzódott vissza mind a kifejlett oldalgyökér, mind az érett gümő esetében. Ezek alapján LIN2 potenciálisan részt vehet a sejtosztódáshoz kapcsolódó feladatok ellátásában. Akár a nyugvó sejtek reaktiválásában, akár a sejtosztódás fenntartásában, például gátló faktorok ubikvitinációjával és proteaszómális lebontásra ítéelésével.

A LIN2 promóter aktívnek mutatkozott a szimbiotikus infekció folyamán is, annak mintegy előfutáraként az infekciós fonal előrehaladásának útját övező sejtekben, de annak mindig előtte járva kapcsolt be, míg a baktériumok el nem érték a gümőprimordiumot. Ez a mintázat nem zárja ki, hogy a LIN2 fehérjének is lehet szerepe a szimbionták infekciója folyamán (is).

Összehasonlításképpen a LIN gének kifejeződési mintázatát illető információ a *M. truncatula* LIN (Kiss et al., 2009) és a *L. japonicus* CERBERUS esetében áll rendelkezésünkre (Yano et al., 2009). A *LjCERBERUS* esetében a transzlációs starthelyét megelőző 3338 bp-t (továbbá a gén terminátor régiójából a stop kodont követő 1001 bp szekvenciát) (Yano et al., 2009), a *MtLIN* génnél a transzlációs starthelyet megelőző 1220 bp-t vizsgálták promóter-riportergén kísérletekben (Kiss et al., 2009). A kísérletek alapján a *LjCERBERUS* promóter a

gyökerekben is mutatott aktivitást, ahol a *M. truncatula* klónozott promóter szakasza nem. A *M. truncatula* szöveteken végzett kvantitatív RT-PCR kísérletek viszont a *L. janponicus*-hoz hasonlóan detektálták a *MtLIN* kifejeződését gyökérben is. A nitrogénkötő szimbiózis folyamán mindkét promóter aktívnak bizonyult a fejlődő gümő primordiumokban (ahol egyébként a folyamat leáll a mutáns egyedekben), illetve később, az érett gümőkben is. A *LjCERBERUS* promóter lehetővé tette a riportergén kifejeződését az érett gümő teljes sejttömegén. Ezzel párhuzamosan a klónozott *MtLIN* promóter szakasz a kifejlett gümők apikális régiójában, a merisztematikus zónában, és a gümősejtek infekciójának helyén mutatott erős aktivitást, a nitrogénkötő bakteroidokat tartalmazó területeken a riportergén csak gyengén fejeződött ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált szekvencia szakaszon kívül egyéb szabályozó elemek is részt vesznek a *M. truncatula LIN* natív, a gyökérben és a nitrogénkötő szimbiózisban szükséges expressziós mintázatának meghatározásában.

A *M. truncatula LIN2* (-2156) promóterrel végzett riportergén vizsgálatok *LIN*-hez igen hasonló expressziós mintázatot mutattak a szimbiózis kialakítása folyamán. Erős riportergén expressziót tapasztaltunk a fejlődő gümőprimordiumok teljes sejttömegén, majd a kifejlett gümők apikális régiójában. A klónozott promóter szakaszokkal kapott eredmények alapján a *M. truncatula LIN* és *LIN2* gének szabályozása nagyon hasonló, tehát natív módon a *LIN2* géntermék potenciálisan azonos helyeken, és azonos időben van jelen, mint a *LIN*. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy amiként a *LIN* gén promóterénél bebizonyosodott, hogy valószínűleg a klónozott régió kívüli szakaszok is részt vesznek a *LIN* kifejeződésének natív mintázatának kialakításában, ugyanez elképzelhető a *LIN2* gén esetében is. Mindenesetre a *LIN2* gén kifejeződésének kvantitatív RT-PCR-rel történő vizsgálata nagyon alacsony mRNS szintet mutatott gyökérben, mely úgy mutatott szignifikáns emelkedést a szimbionta inokuláció után, hogy még így is feltehetőleg messze elmarad a *LIN* gén transzkript szintjétől. Ez tehát szintén arra utal, hogy a riportergén kísérletekben vizsgált *MtLIN2* (-2156) promóter szakaszon kívül, a *LIN* génhez hasonlóan, egyéb szabályozó elemek is befolyásolják, esetleg leszűkítik, vagy gyengítik *LIN2* expresszióját.

A *M. truncatula LIN* és *LIN2* fehérjék aminosav szekvenciája 36%-ban azonos, illetve 58%-ban hasonló, emellett doménfelépítésük is nagyon hasonló. *lin* mutáns növényeken a szimbiotikus infekció korán, az esetek többségében még az epidermiszben leáll. A gyökér belső kéregállományában megindul a sejtosztódás, de a gümő fejlődése primordium állapotban megreked (Kuppusamy et al., 2004; Kiss et al., 2009). A *lin* mutáns növényekben csak a *LIN* gén a hibás, a genomban natív módon jelen lévő *LIN2* sértetlenül működhet, a *lin* mutáns fenotípus mégis megjelenik, tehát a *LIN2* gén nem tudta helyettesíteni a kiesett *LIN* funkciót. Ez azt jelenti, hogy a köztük lévő hasonlóságok ellenére *LIN2* nem képes teljes mértékben betölteni *LIN*

funkcióját. Ez adódhat a két gén eltérő szabályozásából, de lehet a két fehérje szekvenciájának eltéréseiből adódó működésbeli különbségek eredménye is. Jelenleg is folynak csoportunkban kísérletek ennek megválaszolására.

#### **5.2.2.2. Más növényekből származó LIN homologok képesek szimbiotikus funkciót pótolni**

A LIN fehérje nitrogénkötő szimbiózisban betöltött funkciója erősen konzerváltnak bizonyult a pillangósvirágú növények evolúciója folyamán. A *L. japonicus* LIN ortológja, a *CERBERUS* (Yano et al., 2009) komplementációs tesztekben képes volt menekíteni a *lin* mutáns *M. truncatula* növényeket, hiszen funkcionális nitrogénkötő gümők fejlődtek a transzgenikus gyökereken (Kiss et al., 2009). Mi arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon a pillangósvirágú növényeken kívül, a többi növényfajban megtalálható LIN ortológok között vannak-e olyanok, melyek szintén képesek lennének a kiesett gén szimbiotikus funkcióját komplementálni. A fehérjék felépítésében megmutatkozó magas szintű hasonlóság is mindenképp erre ösztönzött minket. A nitrogénkötő gümők kialakítására képes fajok annak a Rosid kládnak a tagjai, melynek legbázálisabb csoportja a Vitales. Ennek egyik faja a *V. vinifera*, mely szimbiotikus gümő kialakítására nem képes. Amikor a *M. truncatula* *lin* mutáns növényeken komplementációs kísérleteket végeztünk a *V. vinifera* LIN szekvenciájával, az teljes mértékben képes volt menekíteni a szimbiotikus mutánsokat. Ekkor egy filogenetikailag még sokkal távolabb eső homologot is teszteltünk a szimbiózisban hibás fenotípus menekítésére, és meglepő módon az *A. capillus-veneris* páfrány LIN homolog szekvenciája is képes volt komplementálni a *lin* mutációt. Ahogy azt a 4.7. ábrán is láttuk, bár az AcvLINh fehérje és a *M. truncatula* LIN között már csökkent a hasonlóság mértéke aminosav szinten, a domén-felépítés még ugyanaz. Emellett az AcvLINh N-terminálisán felismerhető a LIN domén is, mely a fehérje és LIN közötti ortológ kapcsolatot valószínűsíti. Tekintve azt, hogy a két szekvencia több száz millió éve függetlenül fejlődik, bámulatos, hogy az *A. capillus-veneris* fehérje megfelelő módon kifejeztetve mégis képes betölteni a *M. truncatula* LIN fehérje nitrogénkötő szimbiózis során végzett működését. Ennek fényében elmondhatjuk, hogy a növények evolúciója folyamán a LIN ortológ fehérjék szekvenciájában bekövetkező változások alapvetően nem változtatták meg azt a működést, melyet LIN a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajokban végez. Tehát bármilyen szubsztrát vagy szubsztrátok LIN általi ubikvitinációja is szükséges a szimbiotikus baktériumok infekciójának előre haladásához, a más fajokból származó ortológ LIN fehérjék is képesek felismerni és ubikvitinálni azt. Ez azt is jelenti, hogy feltételezhetően a LIN ortológok evolúciója folyamán

igen korán, már jóval a nitrogénkötő szimbiózis első megjelenése előtt kialakult ez a felismerő funkció ezen E3 ubikvitin ligázok és a szubsztátmolekula(k) között.

### **5.2.3. Melyik génduplikációs evolúciós minta fedezhető fel a *LIN* és *LIN2* gének fejlődésében, és ez hogyan tükröződik a funkciójukban?**

A *LIN* és *LIN2* egymás paralógjai, azaz egy ősi *LIN* gén duplikációjával keletkezett gén pár leszármazottai. Egy génduplikációnak több lehetséges kimenetele lehet (Innan, 2009) a későbbi fejlődés során. Történhet génfunkció konzerváció, vagyis az újan keletkezett kópia is megtartja az eredeti génfunkciót, ilyenkor a géntermék dózisa megduplázódik. Történhet delécia vagy pszeudogenizáció, amikor a fennálló két kópia közül az egyik törlődik a genomból vagy működésképtelenné válik. Ilyenkor, ha a két gén még egyformán működött, nem lesz génműködésbeli különbség a duplikáció előtti, illetve a duplikáció és delécia vagy pszeudogenizáció utáni állapot között. Történhet ezen kívül neofunkcionalizáció is, ilyenkor az egyik kópia ellátja az eredeti funkciót, míg a másik szabadon fejlődhet egy új funkció betöltésére. És történhet szubfunkcionalizáció, amikor a létrejövő kópiák mintegy „felosztják” egymás között az eredeti gén funkcióját, és már csak együttesen lesznek képesek ellátni azt. Ilyenkor vagy részleges funkcióvesztés következik be az egyes kópiákban komplementer módon, vagy megváltozik azok génkifejeződési mintázata. Szubfunkcionalizáció során bármelyik kópia kiesésével az eredeti funkció sérül.

A *lin2* mutáns növények esetében nem találtunk sem a növények fejlődését, sem a nitrogénkötő szimbiózist érintő fenotípust. Ennek oka az lehet, hogy a LIN2-által irányított ubikvitinációs folyamatok mindegyike redundánsan biztosított, vagyis hiányában egy másik fehérje, mely feltehetőleg a LIN, képes ellátni a funkcióját. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a *LIN* génnel neofunkcionalizáció történt, mely során eredeti képességeit is megtartotta, de újat is nyert a nitrogénkötő szimbiózis kialakításának folyamatában. Lehetséges, hogy *LIN* szimbiózisban betöltött szerepén túl a *LIN* és *LIN2* azonos, vagy nagy mértékben átfedő feladatokat látnak el. Elképzelhető akár, hogy a géndózis megduplázódása evolúciós előnyökkel járt, vagy LIN és LIN2 átfedő, nem szimbiotikus szerepe létfontosságú működéseket érint, így funkciójuk teljes kiesése letális lenne. Ezt valószínűsíti, hogy *LIN* és *LIN2* széles körűen megtalálható nitrogénkötő szimbiózisra képtelen fajok genomjában is. Kivétel a mind nitrogénkötő, mind mikorrhiza szimbiózisra képtelen *A. thaliana* genom, ami nem kódol LIN homológot, illetve LIN-nel azonos doménfelépítésű fehérjét. Hordoz ugyan egy, a LIN fehérjével domén-összetételében hasonló fehérjét, azonban abból a génből éppen az U-box



domént kódoló szakasz hiányzik, mely a LIN fehérje egyik legfontosabb doménje, hiszen elengedhetetlen az ubikvitinációban betöltött enzimatikus szerepéhez. A *MtLIN* gén U-box domént kódoló szakaszával magas hasonlóságot mutató gén is található *Arabidopsis*-ban, így elképzelhető, hogy ezek a géntermékek egymással együttműködve látják el azt a vitális működést, amit más növényekben a LIN fehérjék végeznek.

Riportergén kísérletekben a *M. truncatula* LIN2 (-2156) promóter aktívnak mutatkozott az oldalgyökérfejlődés teljes folyamata során is, és ahogy azt feljebb ismertettük, a LIN is kifejeződik gyökérben is. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az ősi LIN is a gyökérben volt aktív, akár szerepe lehetett az oldalgyökér fejlődésében is, majd duplikáció után mindkét kópia megtarthatta ezt a működést. Sokan úgy tekintenek a szimbiotikus gümőfejlődésre, mint az oldalgyökér fejlődési program módosulására (Brussel et al., 1992; Huault et al., 2014), így elképzelhető, hogy így tudott „átnyergelni” az egyik gén a szimbiotikus gümő fejlődési programjára is.

Amennyiben azt feltételezzük, hogy a LIN és LIN2 funkciója a szimbiózisban is részben átfedő lehet, előfordulhat, hogy a *lin* mutánsok által mutatott szimbiotikus fenotípus, egy, a LIN2 által részben menekített állapotot tükröz. A működő nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához szükség van egyfelől a gümő sejtömegének kialakítására, másfelől szükség van a gümősejtek megfelelő bakteriális infekciójára. Ha az infekciós folyamat leáll, a gümőfejlődés is megakad. A két folyamat azonban egymástól különválasztható oly módon, hogy a gümő kialakulása a szimbionta baktériumok nélkül is kiváltható a gyökéren. Ha a kalcium-kalmodulin függő kináz *M. truncatula* DMI3 fehérjét aktivált formában termeltetjük, a növények gyökerein szimbionta inokuláció nélkül is, spontán, gümők alakulnak ki (Gleason et al., 2006). A DMI3 *L. japonicus* ortológja, a CCaMK is hasonló módon képes aktiválni a gümőképződés programját (Tirichine et al., 2006). Mind a *M. truncatula lin*, mind *L. japonicus cerberus* mutánsokon végeztek spontán gümözési tesztek a DMI3/CCaMK autoaktív formájával transzformált egyedeken. A *lin* és a *cerberus* növények is képesek voltak spontán gümőket fejleszteni szimbionta inokuláció nélkül, vagyis a LIN/CERBERUS nem bizonyult nélkülözhetetlennek a szimbiotikus gümőfejlődésben (Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009). Ez a jelenség azt is alátámasztja, hogy a Rhizobium baktériumokkal kiváltott szimbiotikus folyamatban az elakadt baktérium infekció az, amely aktívan gátolja a gümőprimordium további fejlődését. Ugyanakkor, a LIN és CERBERUS promótere is erős aktivitást mutatott a gümő primordiumokban. Hasonlóan aktív a LIN2 promóter is a gümőfejlődés során, már a kezdeti sejtszétválásoktól, így nem kizárható, hogy LIN2 képes ellátni LIN gümőképződés során betöltött szerepét, vagyis a spontán gümözési tesztekben a LIN2 egyszerűen komplementálta a hiányzó LIN fehérjét.

Feltételezhetően mind a *LIN*, mind *LIN2* gén jelen volt már a magasabbrendű növények közös ősében, mintegy 400 millió évvel ezelőtt. A legrégebbi, már a jelenkori morfológiát mutató mikorrhiza fosszíliák is ebből a korból származnak (Remy et al., 1994). Mint a szimbiotikus infekció folyamatában szerepet játszó fehérje, a LIN-nek potenciálisan szerepe lehet a mikorrhiza infekció során is. A feltevést gyengíteni látszott, hogy a vizsgált *M. truncatula lin* (Kiss et al., 2009), és a *L. japonicus cerberus* (Yano et al., 2009) mutánsok is képesek voltak mikorrhiza szimbiózis kialakítására. A közelmúltban azonban Takeda és csoportja (2013) átfogóbban vizsgálta a mikorrhiza szimbiózis kialakulásának folyamatát, és csökkent mikorrhiza kolonizációt mutatott ki a *L. japonicus cerberus* mutánsokon, ami a gén mikorrhizációban betöltött szerepére utal. Amennyiben a LIN és LIN2 (illetve *L. japonicus* ortológjaik) azonos vagy átfedő feladatot töltenek be a mikorrhiza szimbiózis folyamán, elképzelhető, hogy a *cerberus* mutáns mikorrhizációs fenotípusa a géndózis csökkenésének következménye, és a *LIN2* gén kiesésével a fenotípus súlyosabbá válna, akár el is veszne a növények mikorrhizációs képessége. A *LIN2* vizsgálata során felmerült számos kérdés, melyek megválaszolásához elengedhetetlenek a kettős mutánsokon végzett kísérletek. A *lin lin2* kettős mutáns *M. truncatula* növények előállítása ezért már folyamatban van csoportunkban.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Endre Gabriellának a lehetőséget, hogy csoportjában dolgozhattam, az útmutatást és támogatást ami munkámhoz, és e dolgozat létrejöttéhez nélkülözhetetlen volt. Köszönettel tartozom továbbá a külföldi tanulmányutakért. Általuk nem csak szakmai tudásom fejlődött, de kutatói kapcsolataim is bővültek, ami meghatározta pályám további alakulását.

Köszönet illeti a Lucerna Genetika csoport valamennyi tagját a munkám során nyújtott segítségükért, és mert bármikor fordulhattam hozzájuk tanácsért. Külön szeretném megköszönni Dr. Kiss Ernőnek, Dr. Kiss Péternek és Jenei Sándornak, hogy megosztották velem tudásukat.

Köszönettel tartozom Dr. Carroll P. Vance-nek, és Prof. Allan J. Downie-nak, amiért látogatást tehettem laboratóriumaikban, ott dolgozhattam, és tanulhattam.

A tudományos előmenetelem és kutatóvá válásom terén kimagasló szerepet játszott Dr. Simona Radutoiu és Prof. Jens Stougaard. Köszönöm bizalmukat, folyamatos szakmai és emberi támogatásukat.

Köszönöm korábbi témavezetőm, Dr. Pénzes Zsolt szakmai tanácsait, és baráti segítségét. Köszönöm Dr. Sipos Botondnak és Dr. Bihari Péternek a baráti hangulatú szakmai beszélgetéseket.

Köszönöm a családomnak türelmüket, és általában erőn fölül nyújtott kitartó támogatásukat. Köszönöm barátaim folyamatos biztatását.

Mindenek fölött pedig köszönöm feleségem türelmét és odaadó szeretetét, ami a kutató munka olykor embert próbáló időszakait segített átvészelni.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Dénarié J, Gough C** (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J Cell Mol Biol* **34**: 495–506
- Ane J-M, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GED, Ayax C, Levy J, Debelle F, Baek J-M, Kalo P, et al** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* **303**: 1364–1367
- Aravind L, Koonin EV** (2000) The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol CB* **10**: R132-134
- Arrighi J-F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Gherardi M, Huguet T, et al** (2006) The *Medicago truncatula* Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes. *Plant Physiol* **142**: 265–279
- Bago B, Pfeiffer PE, Shachar-Hill Y** (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiol* **124**: 949–958
- Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H** (2008) Divergence of Evolutionary Ways Among Common sym Genes: CASTOR and CCaMK Show Functional Conservation Between Two Symbiosis Systems and Constitute the Root of a Common Signaling Pathway. *Plant Cell Physiol* **49**: 1659–1671
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, et al** (2011) The *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Science* **332**: 960–963
- Barthet MM, Hilu KW** (2008) Evaluating evolutionary constraint on the rapidly evolving gene matK using protein composition. *J Mol Evol* **66**: 85–97
- Bersoult A, Camut S, Perhald A, Kereszt A, Kiss GB, Cullimore JV** (2005) Expression of the *Medicago truncatula* DM12 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**: 869–876
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 695–700
- Bozsoki Z, Cheng J, Feng F, Gysel K, Vinther M, Andersen KR, Oldroyd G, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J** (2017) Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. *Proc Natl Acad Sci* 201706795

- Brundrett M** (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* **154**: 275–304
- Brussel AAN van, Bakhuizen R, Spronsen PC van, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW** (1992) Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**: 70–72
- Charpentier M, Bredemeier R, Wanner G, Takeda N, Schleiff E, Parniske M** (2008) Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* **20**: 3467–3479
- Chen C, Fan C, Gao M, Zhu H** (2009) Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol* **149**: 306–317
- Chen ZJ, Sun LJ** (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* **33**: 275–286
- Cheng X, Wen J, Tadege M, Ratet P, Mysore KS** (2011) Reverse genetics in medicago truncatula using Tnt1 insertion mutants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **678**: 179–190
- Ciechanover A, Schwartz AL** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 2727–2730
- Cook DR** (1999) Medicago truncatula--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* **2**: 301–304
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol* **133**: 462–469
- Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savoie V, Aubert G, Brunaud V, de Oliveira Y, Guichard C, et al** (2008) UTILLdb, a Pisum sativum in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol* **9**: R43
- De Mita S, Santoni S, Hochu I, Ronfort J, Bataillon T** (2006) Molecular evolution and positive selection of the symbiotic gene NORK in Medicago truncatula. *J Mol Evol* **62**: 234–244
- Delaux P-M, Séjalon-Delmas N, Bécard G, Ané J-M** (2013) Evolution of the plant–microbe symbiotic ‘toolkit.’ *Trends Plant Sci* **18**: 298–304
- Den Herder G, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Van de Velde W, Clemente MR, Verplancke C, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M, et al** (2008) Seven in Absentia Proteins Affect Plant Growth and Nodulation in Medicago truncatula. *Plant Physiol* **148**: 369–382
- Den Herder G, Yoshida S, Antolín-Llovera M, Ried MK, Parniske M** (2012) Lotus japonicus E3 ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection. *Plant Cell* **24**: 1691–1707
- Denarie J, Debelle F, Prome J-C** (1996) Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**: 503–535

- Dénarié J, Debellé F, Rosenberg C** (1992) Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* **46**: 497–531
- Deshaies RJ, Joazeiro CAP** (2009) RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399–434
- Dickinson WJ** (1995) Molecules and morphology: where's the homology? *Trends Genet TIG* **11**: 119–121
- Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ** (2009) Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 659–671
- Dodd RJ, McDowell RW, Condon LM** (2013) Changes in soil phosphorus availability and potential phosphorus loss following cessation of phosphorus fertiliser inputs. *Soil Res* **51**: 427–436
- Doyle J, Doyle J, Ballenger J, Dickson E, Kajita T, Ohashi H** (1997) A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *Am J Bot* **84**: 541–541
- Doyle JJ** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci* **3**: 473–478
- Doyle JJ** (2011) Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1289–1295
- Duarte J, Wall PK, Edger P, Landherr L, Ma H, Pires JC, Leebens-Mack J, dePamphilis C** (2010) Identification of shared single copy nuclear genes in *Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* and *Oryza* and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evol Biol* **10**: 61
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966
- d'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P** (2003) Efficient transposition of the *Tnt1* tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J Cell Mol Biol* **34**: 95–106
- Fitch WM** (2000) Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet TIG* **16**: 227–231
- Fitch WM** (1970) Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* **19**: 99–113
- Gage DJ** (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280–300
- Gagne JM, Downes BP, Shiu S-H, Durski AM, Vierstra RD** (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11519–11524
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, et al** (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* **70**: 153–226

- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG** (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**: 3489–3499
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Péret B, Laplace L, Franche C, et al** (2008) SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiabacteria. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 4928–4932
- Gianinazzi-Pearson V** (1996) Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871–1883
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annu Rev Genet* **42**: 413–441
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Muñoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GED** (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**: 1149–1152
- Godfroy O, Debellé F, Timmers T, Rosenberg C** (2006) A rice calcium- and calmodulin-dependent protein kinase restores nodulation to a legume mutant. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **19**: 495–501
- Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, et al** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92–100
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Lateral Root Development and Early Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**: 2680–2693
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* **131**: 872–877
- Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, Hofmann K** (2008) Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* **33**: 230–237
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD** (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9975–9979
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788–1795
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB** (2001) Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science* **293**: 1129–1133
- Heckmann AB, Lombardo F, Miwa H, Perry JA, Bunnewell S, Parniske M, Wang TL, Downie JA** (2006) *Lotus japonicus* Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume. *Plant Physiol* **142**: 1739–1750
- Hervé C, Lefebvre B, Cullimore J** (2011) How many E3 ubiquitin ligase are involved in the regulation of nodulation? *Plant Signal Behav* **6**: 660–664

- Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, et al** (2003) Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *Am J Bot* **90**: 1758–1776
- Hirsch AM** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**: 211–237
- Hirsch AM, Larue TA, Doyle J** (1997) Is the Legume Nodule a Modified Root or Stem or an Organ sui generis? *Crit Rev Plant Sci* **16**: 361–392
- Hocher V, Alloisio N, Auguy F, Fournier P, Dumas P, Pujic P, Gherbi H, Queiroux C, Da Silva C, Wincker P, et al** (2011) Transcriptomics of Actinorhizal Symbioses Reveals Homologs of the Whole Common Symbiotic Signaling Cascade1[W]. *Plant Physiol* **156**: 700–711
- Hochstrasser M** (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**: 422–429
- Hohn T, Richards K, Geneviève-Lebeurier** (1982) Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector. *Curr Top Microbiol Immunol* **96**: 194–236
- Holford ICR** (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Res* **35**: 227–240
- Horváth B, Yeun LH, Domonkos A, Halász G, Gobbato E, Ayaydin F, Miró K, Hirsch S, Sun J, Tadege M, et al** (2011) *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 1345–1358
- Hu G, Fearon ER** (1999) Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 724–732
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P, et al** (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet* **41**: 1275–1281
- Huault E, Laffont C, Wen J, Mysore KS, Ratet P, Duc G, Frugier F** (2014) Local and Systemic Regulation of Plant Root System Architecture and Symbiotic Nodulation by a Receptor-Like Kinase. *PLOS Genet* **10**: e1004891
- Innan H** (2009) Population genetic models of duplicated genes. *Genetica* **137**: 19–37
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–467
- Jensen RA** (2001) Orthologs and paralogs - we need to get it right. *Genome Biol* **2**: interactions1002.1-interactions1002.3
- Kalo P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, et al** (2005) Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2, a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. *Science* **308**: 1786–1789
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, et al** (2006) A nucleoporin is required for



- induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 359–364
- Karimi M, Depicker A, Hilson P** (2007) Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *Plant Physiol* **145**: 1144–1154
- Karlowski WM, Hirsch AM** (2003) The over-expression of an alfalfa RING-H2 gene induces pleiotropic effects on plant growth and development. *Plant Mol Biol* **52**: 121–133
- Kiss E, Olah B, Kalo P, Morales M, Heckmann AB, Borbola A, Lozsa A, Kontar K, Middleton P, Downie JA, et al** (2009) LIN, a Novel Type of U-Box/WD40 Protein, Controls Early Infection by Rhizobia in Legumes. *Plant Physiol* **151**: 1239–1249
- Kistner C, Parniske M** (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* **7**: 511–518
- Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ, et al** (2005) Seven *Lotus japonicus* Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root during Fungal and Bacterial Symbiosis. *Plant Cell* **17**: 2217–2229
- Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA** (1994) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **8**: 174–181
- Komander D** (2009) The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* **37**: 937–953
- Komander D, Clague MJ, Urbé S** (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 550–563
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9823–9828
- Kraft E, Stone SL, Ma L, Su N, Gao Y, Lau O-S, Deng X-W, Callis J** (2005) Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1597–1611
- Kuppusamy KT, Endre G, Prabhu R, Penmetsa RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R, VandenBosch KA** (2004) LIN, a *Medicago truncatula* Gene Required for Nodule Differentiation and Persistence of Rhizobial Infections. *Plant Physiol* **136**: 3682–3691
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CAP** (2008) Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle’s Dynamics and Signaling. *PLoS ONE* **3**: e1487
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science* **302**: 630–633

- Lipkowitz S, Weissman AM** (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **11**: 629–643
- Lohmann GV, Shimoda Y, Nielsen MW, Jørgensen FG, Grossmann C, Sandal N, Sørensen K, Thirup S, Madsen LH, Tabata S, et al** (2010) Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 510–521
- Long SR** (1996) Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**: 1885–1898
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczygłowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, et al** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson CW, James EK, Stougaard J** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**: 1–12
- Magallón SA, Sanderson MJ** (2005) Angiosperm Divergence Times: The Effect of Genes, Codon Positions, and Time Constraints. *Evolution* **59**: 1653–1670
- Markmann K, Giczey G, Parniske M** (2008) Functional Adaptation of a Plant Receptor-Kinase Paved the Way for the Evolution of Intracellular Root Symbioses with Bacteria. *PLoS Biol* **6**: e68
- Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GED** (2007) *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiol* **144**: 324–335
- Mbengue M, Camut S, de Carvalho-Niebel F, Deslandes L, Froidure S, Klaus-Heisen D, Moreau S, Rivas S, Timmers T, Hervé C, et al** (2010) The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation. *Plant Cell Online* **22**: 3474–3488
- Merai Z, Kerenyi Z, Molnar A, Barta E, Valoczi A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyan J, Silhavy D** (2005) Aureusvirus P14 Is an Efficient RNA Silencing Suppressor That Binds Double-Stranded RNAs without Size Specificity. *J Virol* **79**: 7217–7226
- Messinese E, Mun J-H, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, Loughon G, Schornack S, Bono J-J, Cook DR, et al** (2007) A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**: 912–921
- Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM** (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* **125**: 531–537
- Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR** (2009) What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J Mol Evol* **68**: 616–628
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kalo P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, et al** (2007) An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction. *Plant Cell* **19**: 1221–1234

- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G** (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* **3**: reviews0004
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD** (1995) External Hyphal Production of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Pasture and Tallgrass Prairie Communities. *Oecologia* **103**: 17–23
- Mindell DP, Meyer A** (2001) Homology evolving. *Trends Ecol Evol* **16**: 434–440
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis KLT, et al** (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* **452**: 991–996
- Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GED, Long SR** (2004) A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4701–4705
- Miyahara A, Richens J, Starker C, Morieri G, Smith L, Long S, Downie JA, Oldroyd GED** (2010) Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component During Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1553–1562
- Miyazawa H, Oka-Kira E, Sato N, Takahashi H, Wu G-J, Sato S, Hayashi M, Betsuyaku S, Nakazono M, Tabata S, et al** (2010) The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development* **137**: 4317–4325
- Mulder L, Lefebvre B, Cullimore J, Imberty A** (2006) LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**: 801–809
- Murakami Y, Miwa H, Imaizumi-Anraku H, Kouchi H, Downie JA, Kawaguchi M, Kawasaki S** (2007) Positional Cloning Identifies *Lotus japonicus* NSP2, A Putative Transcription Factor of the GRAS Family, Required for NIN and ENOD40 Gene Expression in Nodule Initiation. *DNA Res* **13**: 255–265
- Navazio L, Mariani P** (2008) Calcium opens the dialogue between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Signal Behav* **3**: 229–230
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J Cell Mol Biol* **51**: 1126–1136
- Nishimura R, Hayashi M, Wu G-J, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, et al** (2002a) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**: 426–429
- Nishimura R, Ohmori M, Fujita H, Kawaguchi M** (2002b) A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15206–15210
- Nishimura R, Ohmori M, Kawaguchi M** (2002c) The Novel Symbiotic Phenotype of Enhanced-Nodulating Mutant of *Lotus japonicus*: astray Mutant is an Early Nodulating Mutant with Wider Nodulation Zone. *Plant Cell Physiol* **43**: 853–859

- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519–546
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144
- O’Rourke JA, Yang SS, Miller SS, Bucciarelli B, Liu J, Rydeen A, Bozsoki Z, Uhde-Stone C, Tu ZJ, Allan D, et al** (2013) An RNA-Seq Transcriptome Analysis of Orthophosphate-Deficient White Lupin Reveals Novel Insights into Phosphorus Acclimation in Plants. *Plant Physiol* **161**: 705–724
- Oyama T, Shimura Y, Okada K** (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* **11**: 2983–2995
- Parniske M** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Micro* **6**: 763–775
- Patterson C** (1988) Homology in classical and molecular biology. *Mol Biol Evol* **5**: 603–625
- Pawlowski K, Bisseling T** (1996) Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell* **8**: 1899–1913
- Pickart CM** (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**: 503–533
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, et al** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585–592
- Rattei T, Tischler P, Gotz S, Jehl M-A, Hoser J, Arnold R, Conesa A, Mewes H-W** (2009) SIMAP - a comprehensive database of pre-calculated protein sequence similarities, domains, annotations and clusters. *Nucleic Acids Res* **38**: D223–D226
- Redecker D, Kodner R, Graham LE** (2000) Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920–1921
- Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR** (2011) Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **42**: 489–512
- Reid DE, Ferguson BJ, Hayashi S, Lin Y-H, Gresshoff PM** (2011) Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann Bot* **108**: 789–795
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H** (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 11841–11843
- Richardson AE, Simpson RJ** (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiol* **156**: 989–996
- Rodrigo-Brenni MC, Morgan DO** (2007) Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* **130**: 127–139
- Rotin D, Kumar S** (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 398–409

- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, et al** (2007) NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**: 610–624
- Salamov AA, Solovyev VV** (2000) Ab initio Gene Finding in *Drosophila* Genomic DNA. *Genome Res* **10**: 516–522
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ISBN: 0879695773
- Samuel MA, Salt JN, Shiu S-H, Goring DR** (2006) Multifunctional arm repeat domains in plants. *Int Rev Cytol* **253**: 1–26
- Sandhiya GS, Sugitha TCK, Balachandar D, Kumar K** (2005) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian J Exp Biol* **43**: 802–807
- Santos-Gonzalez JC, Finlay RD, Tehler A** (2007) Seasonal Dynamics of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Roots in a Seminatural Grassland. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5613–5623
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, et al** (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes* **15**: 227–239
- Sato S, Tabata S** (2006) *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 128–132
- Savolainen V, Chase MW, Hoot SB, Morton CM, Soltis DE, Bayer C, Fay MF, de Bruijn AY, Sullivan S, Qiu YL** (2000) Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Syst Biol* **49**: 306–362
- Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J** (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**: 191–195
- Schauser L, Wieloch W, Stougaard J** (2005) Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus*. *J Mol Evol* **60**: 229–237
- Schlueter JA, Lin J-Y, Schlueter SD, Vasylenko-Sanders IF, Deshpande S, Yi J, O’Bleness M, Roe BA, Nelson RT, Scheffler BE, et al** (2007) Gene duplication and paleopolyploidy in soybean and the implications for whole genome sequencing. *BMC Genomics* **8**: 330
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al** (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**: 178–183
- Schnabel E, Journet E-P, de Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J** (2005) The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol* **58**: 809–822

- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, et al** (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112–1115
- Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR** (2012) Specific armadillo repeat sequences facilitate  $\beta$ -catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J Biol Chem* **287**: 819–831
- Sharp PM, Li WH** (1987) Molecular evolution of ubiquitin genes. *Trends Ecol Evol* **2**: 328–332
- Shimomura K, Nomura M, Tajima S, Kouchi H** (2006) LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **47**: 1572–1581
- Shiu S-H, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y-H, Mayer KFX, Li W-H** (2004) Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Cell* **16**: 1220–1234
- Smalle J, Vierstra RD** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 555–590
- Smit P, Limpens E, Geurts R, Fedorova E, Dolgikh E, Gough C, Bisseling T** (2007) Medicago LYK3, an Entry Receptor in Rhizobial Nodulation Factor Signaling. *Plant Physiol* **145**: 183–191
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, Geurts R** (2005) NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. *Science* **308**: 1789–1791
- Soderlund C, Bomhoff M, Nelson WM** (2011) SyMAP v3.4: a turnkey synteny system with application to plant genomes. *Nucleic Acids Res* **39**: e68
- Soderlund C, Nelson W, Shoemaker A, Paterson A** (2006) SyMAP: A system for discovering and viewing syntenic regions of FPC maps. *Genome Res* **16**: 1159–1168
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG** (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2647–2651
- Soltis PS, Soltis DE, Chase MW** (1999) Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* **402**: 402–404
- Spaink HP** (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 257–288
- Stewart WN** (1993) *Paleobotany and the Evolution of Plants*. Cambridge University Press
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczylowski K, et al** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, et al** (2008) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res* **36**: D1009–1014

- Swensen SM** (1996) The Evolution of Actinorhizal Symbioses: Evidence for Multiple Origins of the Symbiotic Association. *Am J Bot* **83**: 1503–1512
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, et al** (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **54**: 335–347
- Takeda N, Tsuzuki S, Suzaki T, Parniske M, Kawaguchi M** (2013) CERBERUS and NSP1 of *Lotus japonicus* are common symbiosis genes that modulate arbuscular mycorrhiza development. *Plant Cell Physiol* **54**: 1711–1723
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739
- Teixeira LK, Reed SI** (2013) Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annu Rev Biochem* **82**: 387–414
- The Angiosperm Phylogeny Group** (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* **161**: 105–121
- The Tomato Genome Consortium** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635–641
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, et al** (2006) Deregulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**: 1153–1156
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrechtsen AS, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J** (2007) A Gain-of-Function Mutation in a Cytokinin Receptor Triggers Spontaneous Root Nodule Organogenesis. *Science* **315**: 104–107
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, et al** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596–1604
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, et al** (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS One* **2**: e1326
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P, Kondorosi A, et al** (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
- Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmetsa RV, Cook D, Gough C, Dénarié J, Long SR** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13407–13412
- Windheim M, Peggie M, Cohen P** (2008) Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* **409**: 723–729

- Wojciechowski MF, Lavin M, Sanderson MJ** (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
- Xie Q, Guo H-S, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua N-H** (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* **419**: 167–170
- Yamauchi D, Sutoh K, Kanegae H, Horiguchi T, Matsuoka K, Fukuda H, Wada M** (2005) Analysis of expressed sequence tags in prothallia of *Adiantum capillus-veneris*. *J Plant Res* **118**: 223–227
- Yang Y, Li R, Qi M** (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J* **22**: 543–551
- Yano K, Shibata S, Chen W-L, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, Sandal N, Banba M, Imaizumi-Anraku H, Kojima T, et al** (2009) CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J Cell Mol Biol* **60**: 168–180
- Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, et al** (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20540–20545
- Yee D, Goring DR** (2009) The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot* **60**: 1109–1121
- Yokota K, Fukai E, Madsen LH, Jurkiewicz A, Rueda P, Radutoiu S, Held M, Hossain MS, Szczyglowski K, Morieri G, et al** (2009) Rearrangement of Actin Cytoskeleton Mediates Invasion of *Lotus japonicus* Roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**: 267–284
- Yokota K, Soyano T, Kouchi H, Hayashi M** (2010) Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice. *Plant Cell Physiol* **51**: 1436–1442
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, et al** (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520–524
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK-S, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, et al** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79–92
- Yuan S, Zhu H, Gou H, Fu W, Liu L, Chen T, Ke D, Kang H, Xie Q, Hong Z, et al** (2012) A ubiquitin ligase of symbiosis receptor kinase involved in nodule organogenesis. *Plant Physiol* **160**: 106–117
- Zeng L-R, Vega-Sánchez ME, Zhu T, Wang G-L** (2006) Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res* **16**: 413–426
- Zhang X-C, Cannon SB, Stacey G** (2009) Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC Evol Biol* **9**: 183



- Zhang X-C, Wu X, Findley S, Wan J, Libault M, Nguyen HT, Cannon SB, Stacey G (2007)** Molecular Evolution of Lysin Motif-Type Receptor-Like Kinases in Plants. *Plant Physiol* **144**: 623–636
- Zhu H, Riely BK, Burns NJ, Ane J-M (2006)** Tracing Nonlegume Orthologs of Legume Genes Required for Nodulation and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Genetics* **172**: 2491–2499
- Zhuang M, Guan S, Wang H, Burlingame AL, Wells JA (2013)** Substrates of IAP Ubiquitin Ligases Identified with a Designed Orthogonal E3 Ligase, the NEDDylator. *Mol Cell* **49**: 273–282

## 8. Összefoglaló

A talaj növények számára felvehető tápanyagtartalma számos termőhelyen korlátozó tényező a növényi fejlődés, produktivitás tekintetében. Erre a kényszerre adott evolúciós léptékű válasz lehet a talajlakó mikroorganizmusokkal létrehozott szimbiotikus asszociáció, mely fontos makroelemeket juttat a növénynek a fotoszintézis cukortermékeiért cserébe. Egy ősi együttélési forma a gombákkal kialakított arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis. Ennek révén elsősorban foszfátvegyületekhez jut a növény. Kialakítására a szárazföldi növényfajok túlnyomó hányada képes. Ez a tulajdonság feltételezhetően már jelen volt a szárazföldi növények közös őseiben is, vagyis azok a fajok, melyek ma nem léphetnek szimbiózisra mikorrhiza gombákkal, e képességüket elvesztették az evolúciójuk folyamán. Emellett a törzsfajlás során sokkal később egy másik szimbiotikus együttélési forma is megjelent bizonyos nitrogénkötő talajbaktériumok és közeli rokon növényfajok egy szűk csoportja között. A nitrogénkötő endoszimbiózis kialakítása folyamán egy új növényi szerv képződik, a gyökérgümő. A szimbionta baktériumok ebben végzik a légköri dinitrogén ammóniává történő redukcióját, ami a növény számára is hasznosítható szerves molekulákba épül be. E két szimbiózis folyamán működő növényi gének vizsgálata felfedte, hogy bizonyos gének mindkét együttélés kialakításához nélkülözhetetlenek. Ezek az ún. közös szimbiotikus útvonal génjei. A jelenleg elfogadott tudományos nézet szerint feltételezhető, hogy az ősi mikorrhiza rendszer már meglévő molekuláris apparátusának bizonyos elemeit felhasználva fejlődött a nitrogénkötő endoszimbiózis. Ennek a folyamatnak a megértéséhez szeretnénk közelebb jutni ezeknek a géneknek és géntermékeknek az evolúciós és funkcionális vizsgálatával.

Evolúciós elemzésünkhöz kiválasztottunk 16 *M. truncatula* gént, melyek fehérje termékei változatos szerepet töltenek be a nitrogénkötő szimbiózis kialakítása folyamán. Ezek között szerepelnek a nitrogénkötő szimbiózisra specifikus, és a közös szimbiotikus útvonalba tartozó gének is. Kiválasztottunk továbbá 12, a nitrogénkötő szimbiózisban ismert szereppel nem rendelkező szekvenciát, melyeket kontrollokként alkalmaztunk. A kiválasztott gének fehérjetermékeinek szekvenciájával adatbáziskereséseket végeztünk a zárvatermők rendszertani fájának különböző csoportjaiból választott tíz növény szekvenciái között, melyek genomszekvenálása már befejezett, vagy közel befejezett fázisban tartott. A fajok között nitrogénkötő szimbiózisra képes, és arra képtelen kétszikű, illetve egyszikű növények szerepeltek. Mindegyikük képes mikorrhiza szimbiózis kialakítására, kivéve az *A. thaliana*-t, mely nem képes egyik szimbiózisra sem. Minden genomból kiválasztottunk egy-egy olyan szekvenciát, mely hosszban és aminosav összetételben a referenciaként használt *M. truncatula* aminosav szekvenciához a legnagyobb hasonlóságot mutatta. Ezeket a továbbiakban feltételezett

ortológokként kezeltük. Közülük reciprok BLAST keresésekkel szűrtük ki a fals ortológ találatokat. A legtöbb ortológ kópia az *A. thaliana* genomjából hiányzott, mely sem nitrogénkötő, sem mikorrhiza szimbiózis kialakítására nem képes. Vélhetően ez utóbbi képességet törzsfejlődése során elvesztette. Ezzel összefüggésben veszíthette el szimbiotikus génjeinek jelentős hányadát is. Azok az ortológok, melyek még jelen vannak a genomjában, feltehetőleg egyéb fontos, nem szimbiotikus funkcióval rendelkeznek.

Az összegyűjtött leghasonlóbb szekvenciákat először hosszukban hasonlítottuk össze annak eldöntésére, hogy történtek-e nagyobb, akár teljes domén(ek)e)t érintő változások bizonyos fehérjék fejlődése során. Jelentősebb hosszbeli eltérést csupán néhány szimbiotikus fehérje homológja esetén tapasztaltunk. A referencia szekvenciához képest több mint 20%-os eltérést mutatott három *A. thaliana* paralóg és az egyszikű DMI2 ortológok. Szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a DMI2 ortológok a növények evolúciója folyamán úgy fejlődtek, hogy extracelluláris doméneket szereztek. Ezek közül a hosszabb szekvenciák képesek menekíteni a megfelelő *L. japonicus* szimbiotikus mutánsok hibás gümöző és mikorrhiza fenotípusát, míg a rövidebb egyszikű DMI2 ortológ szekvencia csak a mikorrhiza szimbiózis hibáját tudja komplementálni. Az egyszikűek NSP2 homológjai, és a *Z. mays* ERN1 szekvenciája mutatott még 10-15%-os hosszeltérést az adott referenciához képest, InterPro doménkeresésekkel azonban nem tudtunk extra doméneket kimutatni ezekben a fehérjékben. Emellett szakirodalomból tudjuk, hogy az *O. sativa* hosszabb NSP2 homológja teljes mértékben képes komplementálni a *L. japonicus nsp2* mutánsokat.

A kiválasztott feltételezett ortológ szekvenciákat egyenként, aminosav szinten, páronkénti illesztésben hasonlítottuk össze a megfelelő *M. truncatula* referencia fehérjével. Az egyes illesztési pozíciókban kapott megegyező aminosavak százalékos aránya az ún. ID érték, ezt használtuk a géntermékek további elemzésében. Az egyes géntermékek ID adatait a vizsgálatba vont fajoknak a referencia *M. truncatula*-tól számított rendszertani távolsága szerint rendeztük sorba. Az egyes géntermékek evolúciós módosulásait azok ID értékeit követve vizsgáltuk a fajok során át, és két alkalommal tapasztaltunk jelentősebb változást az adatokban. Az első a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajok és az egyéb, erre nem képes kétszikűek között, a második a kétszikű és egyszikű fajok értékei között jelentkezik. Az ID értékekben tapasztalható hirtelen csökkenés oka lehet az adott géntermék növényi evolúció folyamán mutatott általánosan gyors változása, vagy a géntermékeket formáló bizonyos különbségek okai lehetnek egy adott funkcióból eredő specifikusan ható evolúciós erők is. Esetünkben ez a nitrogénkötő szimbiózis kialakításának képessége, melynek nyomait a pillangósvirágú növények és az egyéb kétszikűek közti értékek között találhatjuk. A kétszikűek és egyszikűek között pedig két olyan csoport nem gümöző fajainak értékei között figyelhetjük meg a változást, ahol a nitrogénkötő szimbiózist

formáló szelekciós erők valószínűleg nem hatottak. A mért ID érték változás mértéke itt közvetlenül utalhat az adott géntermék evolúciójának sebességére. A fajcsoportok közötti ID érték változásokra jellemző mintázat alapján az egyes fehérjéket három csoportba soroltuk. Az **A** (szimbiotikus) és az **A'** (kontroll) csoportokba olyan géntermékek kerültek, melyeknél a gümöző és nem gümöző kétszikű fajok között, valamint a kétszikű és egyszikű fajok között is csekély mértékű az ID értékek változása. Az adott géntermék lassan változott a zárvatermő növények evolúciója során, szekvenciája jól konzervált. Mivel szekvenciája a gümöző fajokban sem változott meg lényegesen más kétszikűekhez viszonyítva, feltételezhető, hogy a nitrogénkötő szimbiózisban betöltött működéséhez nem volt szükség kiterjedt szekvencia változásokra. Ez arra utalhat, hogy az **A** kategóriába sorolt szimbiotikus fehérjék csoportjában a nem gümöző fajokból vett ortológok megfelelő kifejeztetés mellett nagy eséllyel képesek ellátni a gümöző növényekben a szimbiotikus feladatokat. Ezt a szakirodalomban elérhető transz-komplementációs kísérletek eddigi eredményei megerősíteni látszanak. A **B**, illetve **B'** csoportba azok a szekvenciák tartoznak, amelyek jelentős ID érték csökkenést mutattak a gümöző és nem gümöző kétszikű fajok között, azonban az értékeik nem változtak számottevően a kétszikűek és egyszikűek között. Ezekre a géntermékekre feltehetőleg nem jellemzőek a gyors evolúciós változások, ugyanakkor jelentős szekvencia eltérések jelentek meg a gümöző fajokban. Ez jelezheti azt, hogy a bekövetkezett szekvencia változások - legalább részben - a fehérjék nitrogénkötő szimbiózisban végzett működéséhez szükségesek. Ha ez igaz, akkor csak kicsi a valószínűsége, hogy e fehérjék nem-gümöző növényekből származó ortológjai képesek lennének szimbiotikus működést elvégezni a pillangósvirágúak nitrogénkötő szimbiózisa során. Ezzel összhangban van az, hogy a szakirodalomban elérhető transz-komplementációs vizsgálatok többségében a **B** kategóriába sorolt pillangósvirágú gének nem gümöző fajokból vett ortológjai csak részlegesen, vagy egyáltalán nem voltak képesek komplementálni a megfelelő, nitrogénkötő szimbiózisban mutáns pillangósvirágú növényeket. A **C** és **C'** kategória génjei, a mindkét vizsgált fajcsoport határon jelentékeny ID érték esést mutató szekvenciák, feltételezhetően gyorsan változtak a növényi evolúció folyamán. Ha emellett megtartották az eredeti funkciójukat, akkor valószínűleg jelentős szekvencia flexibilitás jellemzi őket. Flexibilitásuk révén könnyen változhattak, és változásuk eredményeképp akár új működéseket is képesek lehettek elvégezni. Ilyen funkció lehetett a gümöző fajokban lévő kópiák nitrogénkötő szimbiózisban betöltött szerepe is. Ez alapján a **C** kategória elemeinél két lehetőséget is figyelembe kell vennünk: 1) vagy a **B** kategória tagjaihoz hasonlatosan, a szekvencia evolúciójuk folyamán specializálódtak a nitrogénkötő szimbiózisra, vagy 2) a változás inkább a gyors evolúciós sebesség következménye, mely nem eredményezett a szimbiózis szempontjából minőségi változást a működésükben. A **C** kategória tagjaival végzett komplementációs tesztek

eddig kivétel nélkül az utóbbi eshetőséget erősítik: a nem gümöző növényekből vett ortológ szekvenciák transz-komplementációs tesztekben pozitívnak bizonyultak. A felállított evolúciós kategóriák megtalálhatóak mind a szimbiotikus, mind a kontroll szekvenciák között. De míg a kontrollok zöme a lassan változó, jól konzervált szekvenciák közé volt sorolható (A'), a szimbiotikus szekvenciák inkább a B vagy a C kategóriákba kerültek. Ez utalhat arra, hogy specifikus változások kellettek ahhoz, hogy ezek a fehérjék a szimbiózisban végzett működésüket megvalósíthassák, illetve utalhat akár arra is, hogy a gyors szekvencia evolúciót mutató géntermékek preferenciálisan verbuválódtak a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szükséges gének sorába.

Egy részletesebb filogenetikai elemzést és funkcionális vizsgálatokat a *LIN* gén család tagjaival végeztünk. A *M. truncatula* *LIN* gén egy, a nitrogénkötő endoszimbiózis kialakításában nélkülözhetetlen szerepet játszó fehérjét kódol. A *LIN* génnek azonosítottuk a paralógját, melyet *LIN2*-nek neveztünk el. A *LIN* és *LIN2* fehérjék doménfelépítésükben igen hasonlóak: tartalmaznak egy U-box és egy Armadillo domént, valamint több WD40 domént. Feltételezhetően mindketten E3 ubikvitin ligázok.

A szárazföldi növényeket jól reprezentáló szekvenált genomokból adatbázis keresésekkel összegyűjtöttük az elérhető *LIN* és *LIN2* szekvenciákat. A vizsgált kétszikűekben jellemzően egy *LIN* és egy *LIN2* ortológot találtunk. Az adott szekvenciák között fennálló ortológ/paralóg viszonyt a szekvencia hasonlóságon túl, az elérhető szekvenciák felhasználásával készült NJ filogenetikai fa topológiája, és a géneket hordozó kromoszóma szakaszok összevetésével végzett szinténia vizsgálat is megerősítette. Az elérhető egyszikű genomokban csak egyetlen *LIN* homológot találtunk, melyek a filogram és a szinténia analízis alapján is *LIN2* ortológoknak bizonyultak. A *LIN* és *LIN2* szekvenciát megtaláltuk a zárwatermők rendszertani fájának legbazálisabb kládjába, a boglárkavirágúak (*Ranunculales*) közé sorolt kolorádói kék harangláb (*Aquilegia caerulea*) genomjában, illetve az egy- és kétszikű fejlődési vonalak szétválása előtt jóval korábban elkülönült harasztok közé sorolható csipkeharaszt (*Selaginella moellendorffii*) szekvenciák között is. Ez arra utal, hogy *LIN* és *LIN2* ortológja már jelen volt a magasabbrendű növények (*Tracheophyta*) közös ősenek genomjában. Ezen kívül azt is valószínűsíti, hogy vagy bizonyos egyszikű vonalak, vagy akár már az egyszikűek közös őse elvesztette a *LIN* kópiát.

A *LIN* gén nitrogénkötő szimbiózis során végzett működésének evolúciós vizsgálatához ortológjait klónoztuk a nem gümöző kétszikű szőlő (*Vitis vinifera*), és a vénuszhaj páfrány *Adiantum capillus-veneris* fajból is. Ezek a *M. truncatula* fehérjével összevetve igen konzervált doménfelépítést mutattak. Megfelelő kifejeztetés mellett mindkét ortológ kópia képes volt menekíteni a *M. truncatula* *lin* mutáns növények nitrogénkötő szimbiózis-defektív fenotípusát. Ennek fényében elmondhatjuk, hogy a növények evolúciója folyamán a *LIN* ortológ fehérjék

szekvenciájában bekövetkező változások alapvetően nem változtatták meg azt a működést, melyet LIN a nitrogénkötő szimbiózisra képes fajokban végez. Továbbá ez a működés a LIN ortológok evolúciója folyamán igen korán, már jóval a nitrogénkötő szimbiózis első megjelenése előtt kialakult.

A *LIN2* génről, illetve fehérje termékéről kísérletes adat korábban nem állt rendelkezésre, ezért elvégeztük annak analízisét. Riporter gén vizsgálatokban a *M. truncatula* *LIN2* gén 2156 bp-os promóter szakasza erős aktivitást mutatott az oldalgyökér kezdeményekben a korai sejtosztódásoktól egészen a kifejlett állapotig, és hasonló módon volt nyomon követhető a gümőfejlődés teljes folyamatán keresztül. Ez az aktivitás később fokozatosan a merisztematikus sejteket tartalmazó területekre húzódott vissza mind a kifejlett oldalgyökér, mind az érett gümő esetében. Ezek alapján *LIN2* potenciálisan részt vehet a sejtosztódáshoz kapcsolódó feladatok ellátásában. Emellett a *LIN2* promóter aktívnak mutatkozott a szimbiotikus infekció folyamán is, annak mintegy előfutáraként az infekciós fonal előrehaladásának útját övező sejtekben, de annak mindig előtte járva kapcsolt be, míg a baktériumok el nem érték a gümőprimordiumot. Ez a mintázat utalhat arra, hogy a *LIN2* fehérjének is lehet szerepe a szimbioták infekciója folyamán (is).

Heterológ rendszerben végzett sejten belüli lokalizációs vizsgálatokkal, *N. benthamiana* levélen, a *M. truncatula* *LIN2* fehérjét kimutattuk a sejtmagban, az endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában is. A fehérje tömege 149 kDa, az ilyen méretű molekulák már csak aktív transzporttal juthatnak át a sejtmag membrán pórusain, de az *in silico* vizsgálatok nem prediktáltak magi lokalizációs szignált *LIN2* szekvenciáján. Elképzelhető, hogy a *LIN2* fehérje az egér  $\beta$ -kateninhez hasonló módon, Armadillo doménje által jut keresztül a sejtmagi pórus komplexeken, akár más fehérjéket is magával szállítva.

A *M. truncatula* inszerciós mutagenézis program adatbázisában számos, a *LIN2* génben *Tnt1* retrotranspozont hordozó vonalat azonosítottunk. Ezek közül kettőt részletesen elemeztünk. A *lin2-1* és *lin2-2* mutánsok sem általános fejlődési, sem a nitrogénkötő szimbiózis folyamán megfigyelhető rendellenességet nem mutattak, ami arra utal, hogy a *LIN2* gén nem nélkülözhetetlen a funkcionális nitrogénkötő endoszimbiózis kialakításához, illetve a normális egyedfejlődéshez. Tekintve, hogy a LIN és *LIN2* fehérjék doménfelépítése és promóter aktivitása nagyon hasonló, elképzelhető, hogy LIN képes elvégezni *LIN2* feladatát is, így elkendőzi a *lin2* mutánsokban a *LIN2* géntermék kiesésének következményeit. Ez, legalábbis részben, fordított módon is elképzelhető. A *lin* mutáns növényekben, melyekben csak a *LIN* hibás, *LIN2* épen jelen van a *M. truncatula* genomban, a *LIN2* nem képes menekíteni a *lin* mutációt. Nem kizárt azonban, hogy bizonyos funkciókat a LIN és *LIN2* redundánsan lát el. Ezen gének és fehérjék funkciójának vizsgálata a jövőben folytatódik a kutatócsoportban.

## 9. Summary

Soil nutrient availability is a major limiting factor in plant growth and productivity at many areas under agricultural cultivation. An evolutionary answer to this demand is the symbiotic association of plants with soil microbes that provide valuable macronutrients to the host for a share of the sugar compounds of photosynthesis, as an exchange. An ancient type of coexistence is the arbuscular mycorrhiza symbiosis formed with fungi that provide mainly phosphates to the plants. The majority of land plant species are able to form mycorrhiza symbiosis. It is hypothesized that this capability was present already in the common ancestor of all land species, hence those recent species that do not form mycorrhiza, most probably lost this ability during their evolution. In addition, much later in evolution, another form of symbiotic coexistence appeared between certain nitrogen fixing soil bacteria and a group of closely related plant species. During nitrogen fixing symbiosis a new organ, the root nodule is formed, where the symbiotic bacteria reside and fix atmospheric nitrogen, which is then converted to organic molecules that can be used by the plant. Analyzing the plant genes needed for these symbioses revealed that some of them are indispensable for both types of co-existence. These are the elements of the so-called common symbiotic pathway. It is hypothesized that the phylogenetically much younger nitrogen fixing symbiotic system was developed on the molecular grounds of the more ancient mycorrhiza symbiosis, recruiting elements from the already existing signaling pathways. We aim to understand this process through the evolutionary and functional analyses of these genes and gene products.

For our evolutionary analysis we chose 16 *M. truncatula* genes coding for proteins with diverse functions during nitrogen fixing symbiosis. Most of them are specific for nitrogen fixing symbiosis, but some elements are part of the common symbiotic pathway. Additionally, we chose 12 sequences with no proven symbiotic function, to use them as controls. The selected symbiotic and control *M. truncatula* sequences were used as queries while searching for their homologs in the available genome sequences of ten plant species from different groups of the angiosperm phylogenetic tree. Two other legume species, that are able to form nitrogen fixing root nodule symbiosis, were picked, and other non-nodulating dicot and also monocot species were selected for further analysis. All these species were capable of mycorrhiza symbiosis with the one exception of *A. thaliana* that is incapable of either the mycorrhiza or the nitrogen fixing symbiosis. After the BLAST searches with the *M. truncatula* amino acid sequences a single homologous sequence from each plant genome - that showed the highest similarity to the respective reference sequence - was chosen to work with. These homologous sequences were considered as putative orthologs. Reciprocal BLAST searches were used to identify and filter out

the false ortholog hits. The general model plant *A. thaliana* revealed the highest number of missing orthologous sequences. It is unable to form even mycorrhiza symbiosis, most probably lost this ability during its evolution, and supposedly, in connection with this, also lost the vast majority of its symbiosis related genes. Those orthologous sequences that are still present in the *A. thaliana* genome may have an important role in other, non-symbiotic function.

First we compared the collected most similar sequences in their length on the amino acid level to see whether some of them went through larger changes in their length during their evolution that could possibly affect their domain composition. Considerable length differences could only be detected for orthologous sequences for some symbiotic proteins. More than 20% difference in length compared to the respective reference *M. truncatula* sequence were shown for three *A. thaliana* paralogs, and the monocot DMI2 orthologous sequences. We know from the literature that DMI2 orthologs developed by extracellular domain acquisition during plant evolution. Among these, the ones with longer sequences were able to complement both the defective mycorrhiza and nitrogen fixing symbiosis phenotype of the respective *L. japonicus* mutants, while the shorter monocot orthologous sequence could only restore mycorrhiza symbiosis in trans-complementation experiments. Moreover, the two monocot NSP2 homologs and the *Z. mays* ERN1 sequence showed 10-15% difference in length compared to the respective reference sequence, but no extra domains in these proteins could be detected by InterPro database analysis. Also it is known from the literature that the extended length *O. sativa* NSP2 ortholog with extended length was able to fully complement the *L. japonicus nsp2* mutants.

The selected putative orthologs were compared to the respective *M. truncatula* reference sequence at amino acid level one by one, in pairwise alignments. The percent proportion of the identical amino acids among the alignment positions resulted in the ID values, while similar amino acid substitutions in similarity (*SIM*) values that were all organized in a table. The more stringent ID values were used for subsequent analysis of the variations in the gene products from the chosen plant species through the phylogenetic tree. We arranged the ID values of the given putative orthologous proteins according to the species showing an increasing phylogenetic distance from the reference *M. truncatula*, then the modifications of the gene products were analyzed by following the changes in their ID values through the species tested. There were two positions where greater changes were experienced. The first one was between the values of nodulating and non-nodulating dicots along the row of tested species, while the second one was between dicots and monocots. Large drops in the changes of the ID values could be due to generally occurring fast modifications of a given gene product during plant evolution, which can be mirrored by the differences of the ID values between the dicots and the monocots. Alternatively, in some cases specifically acting evolutionary forces could cause particular



differences in certain gene products for a particular function. In our example this latter is the ability to form nitrogen fixing symbiosis, which reflected in the ID value changes between the nodulating and non-nodulating dicot species. Based on the deviations in ID values detected in our data between the different groups of species the proteins fell into three categories. The **A** (symbiotic) and **A'** (control) categories consist of gene products for which the ID value changes are both moderate between the nodulating and non-nodulating dicot species, and between the dicots and monocots. The amino acid composition of these gene products changed slowly during the evolution of angiosperm species, so their sequences are well conserved. The sequences of these proteins did not show great changes in the nodulating species compared to other dicots, i.e. they did not need extensive sequence modifications to be able to fulfill their function in nitrogen fixing symbiosis. This suggests that for symbiotic proteins in category **A**, the orthologous counterparts taken from non-nodulating species can possess a high probability for being capable of fulfilling the symbiotic functions. The results of trans-complementation experiments available in the literature so far are confirming this hypothesis. The sequences that show considerable fall in the ID values between nodulating and non-nodulating species, but in the same time barely changed between dicots and monocots, belong to categories **B** and **B'**, respectively. These sequences are most probably members of slow evolving proteins showing extensive amino acid changes in the nodulating species. Therefore it is highly possible that the changes accumulated in their sequences during their evolution (at least in part) were needed for them to be able to achieve their function in nitrogen fixing symbiosis. If that was true, it is rather unlikely that their orthologs from non-nodulating species could accomplish the symbiotic functions of their legume counterparts. In accordance with this, several papers in the literature reported trans-complementation studies using orthologous sequences of symbiotic proteins of category **B** from non-nodulating genomes that could only partly, or could not complement at all the respective symbiotic mutant legume plants. Gene products of categories **C** and **C'** show remarkable fall in ID values at both borders of the above mentioned groups of species, suggesting fast evolution for these sequences during plant evolution. Despite of these variations if at the same time these proteins retained their original function, they demonstrate extensive compositional flexibility. Due to this flexibility they could easily change, and even gain new functional abilities through their changes. Such a new application of a function might be what the orthologous copies of the nodulating species perform during symbiosis. Considering this, there are two possibilities with the members of category **C**: 1) either these gene products went through sequence specialization during evolution to be able to fulfill functions in nitrogen fixing symbiosis, similarly to category **B** sequences, or 2) the changes in their sequences are simply due to their fast evolution and did not result in symbiosis-specific changes in their functional capabilities. Complementation studies

available in the literature done with category **C** sequences are without exception confirming so far the latter possibility. All of their tested orthologs from non-nodulating species showed to be fully successful in rescuing the respective legume symbiotic mutants. Each of the evolutionary categories specified in this study can be found among the symbiotic (**A**, **B**, **C**) and also the control (**A'**, **B'**, **C'**) sequences. However, while the majority of the control sequences belonged to the slow evolving, well-conserved category (**A'**), the symbiotic gene products mostly fell into categories **B** or **C**. This suggests that most of the sequences that are essential in nitrogen fixing symbiosis had to acquire specific sequence changes to be able to accomplish their symbiotic function, or alternatively, fast evolving sequences were preferentially recruited.

A more detailed phylogenetic study and functional analyses were performed on the members of the *LIN* gene family. The *M. truncatula* *LIN* gene codes for a protein indispensable for nitrogen fixing symbiosis. Searching for *LIN* homologs in sequence databases led to the identification of its paralogous counterpart in *M. truncatula* that was designated as *LIN2*. The *LIN* and *LIN2* proteins are very similar in domain composition: both consist of a U-box and an Armadillo domain, together with WD40 repeats at their C-terminus. Both are putative E3 ubiquitin ligases.

The available *LIN* and *LIN2* sequences were collected from representatives of the land plant species with sequenced genomes and a detailed analysis was performed with them. In the dicot species tested generally one *LIN* and one *LIN2* ortholog was identified. Beyond the sequence similarities the prepared Neighbor-Joining phylogenetic tree consisting of the available *LIN* homologs and synteny data from comparison of the chromosomes carrying the sequences confirmed the ortholog/paralog relationship between the particular gene products. The tested monocots carried only one *LIN* homolog counterpart, which proved to be orthologous with the *LIN2* genes according to the phylogram and the synteny analysis as well. *LIN* and *LIN2* orthologs can also be found in the most basal clade of angiosperms, in the *Aquilegia caerulea* (Ranunculales) genome, as well as among a group that diverged much earlier than the monocot-dicot split, the lycophytes, in the *Selaginella moellendorffii* genome. This implied that *LIN* and *LIN2* had to be present in the common ancestor of higher plants (Tracheophyta). Also, it suggests that either some monocot lineages or already the common ancestor of all monocot species lost the *LIN* orthologous copy. However, more information from fully sequenced genomes are needed from distinct groups of the monocot phylogenetic tree to resolve this.

To analyze the functional aspects of the evolutionary changes in the symbiotic *LIN* gene, we identified and cloned its orthologs from the non-nodulating dicot *Vitis vinifera* and the fern *Adiantum capillus-veneris*. Both showed highly conserved domain composition compared to the *M. truncatula* protein. Providing appropriate expression both orthologous copies were able to

rescue the nitrogen fixing symbiosis-defective *lin* mutant plants in trans-complementation experiments. This indicated that the sequence variations found in LIN orthologs did not affect the function of the symbiotic LIN copies that is needed for nitrogen fixing nodule formation. In addition, this function appeared early during plant evolution, way before the first appearance of nitrogen fixing symbiosis, and so it was recruited for this process.

No experimental data was available for the *LIN2* gene and gene product earlier, so we performed its analysis. The activity of a 2156 bp DNA fragment from the 5' UTR promoter region of the *M. truncatula* *LIN2* gene was tested in fusion with a reporter gene using hairy root transformation. This promoter showed high activity in lateral root primordia starting from the very early cell divisions until the fully developed state in *M. truncatula* roots. Similarly, the promoter showed to be active during the entire process of nodule development. At later steps this activity became restricted to the meristematic regions both for the developed lateral roots and the nodules as well. Based on these results *LIN2* potentially could have a role during cell division or cell cycle control. Moreover, the *LIN2* promoter was active during symbiotic infection. It was active in the cells surrounding the infection thread, but always preceding its path until the bacteria reached the nodule primordium. This may suggest a possible role for *LIN2* upon microsymbiont infection.

We analyzed the subcellular localization of the *M. truncatula* *LIN2* protein in a heterologous system, since the protein could not be detected in *M. truncatula* hairy roots. In *N. benthamiana* leaves the signals of the fluorescent tagged gene product were perceived in the cytoplasm, the ER and the nucleus. The molecular mass of the *M. truncatula* *LIN2* protein is 149 kDa. Molecules of this size can only pass through the nuclear pore complexes by active transport mechanisms, but no nuclear localization signal was detected on its amino acid sequence. It is possible that similarly to  $\beta$ -catenin, *LIN2* could pass the nuclear pores with the help of its Armadillo domain, even simultaneously binding to other molecules and carrying them as cargo.

Screening the *M. truncatula* insertional mutant database we found several lines carrying a *Tnt1* retrotransposon insertion in the *LIN2* gene. We chose two of them for detailed analysis. The *lin2-1* and *lin2-2* mutant plants did not show any kind of general developmental anomalies or defects during nitrogen fixing symbiosis. This suggested that the *LIN2* gene itself is not indispensable for the establishment of functional nitrogen fixing symbiosis. Considering that the expression pattern and also the domain composition of LIN and *LIN2* proteins are very similar, it is possible that LIN may be capable of fulfilling the function of *LIN2*, so conceals the phenotypic consequences of disrupting the *LIN2* gene function in *lin2* mutant plants. This, at least in part, may be possible on the other way around too. In *lin* mutant plants in which only the *LIN* gene is defective, but *LIN2* is present in an unaffected form in the *M. truncatula* genome,

*LIN2* is not able to rescue the *lin* mutation. However, it is possible that *LIN* and *LIN2* accomplish some functions redundantly. The research revealing the function(s) of these genes and proteins is continued in our laboratory.

## 10. MELLÉKLETEK

Géntermék	Faj	GenBank (TAIR)/ Phytozome azonosító	Forrás adatbázis	A kódoló szekvencia predikcióhoz használt DNS szekvenciák (GenBank azonosító)
szimbiotikus szekvenciák				
LYK3	<i>Mt</i>	AAQ73155	GenBank	ACYN01001515 NC_008468 DS981652; DS981607
	<i>Ps</i>	ACE81772		
	<i>Lj</i>	CAE02589		
	<i>Cs</i>	jelen munka		
	<i>Pt</i>	jelen munka		
	<i>Cp</i>	jelen munka		
	<i>At</i>	NP_566689		
	<i>Vv</i>	XP_002270987		
	<i>Sl</i>	ADL16642		
	<i>Os</i>	jelen munka		
	<i>Zm</i>	ACG29351		
NFP	<i>Mt</i>	ABF50224	GenBank	ACHR01010185
	<i>Ps</i>	CAE02593		
	<i>Lj</i>	CAE02597		
	<i>Cs</i>	jelen munka		
	<i>Pt</i>	XP_002310198		
	<i>Cp</i>	evm.model.supercontig_15.133		
	<i>At</i>	NP_179957		
	<i>Vv</i>	XP_002269472		
	<i>Sl</i>	NP_001233936		
	<i>Os</i>	AAM19130		
	<i>Zm</i>	jelen munka		
DMI1	<i>Mt</i>	Q6RHR6	GenBank	NW_001492725 ABIM01018271; ABIM01018272; ABIM01018273
	<i>Ps</i>	CAJ00334		
	<i>Lj</i>	Q5H8A5		
	<i>Cs</i>	Cucsa.076120.1		
	<i>Pt</i>	jelen munka		
	<i>Cp</i>	jelen munka - részleges		
	<i>At</i>	NP_199807		
	<i>Vv</i>	jelen munka		
	<i>Sl</i>	jelen munka		
	<i>Os</i>	jelen munka		
	<i>Zm</i>	GRMZM2G110897_T01		
DMI2	<i>Mt</i>	Q8L4H4	GenBank	DS981649
	<i>Ps</i>	Q8LKZ1		
	<i>Lj</i>	AAM67418		
	<i>Cs</i>	Cucsa.349010.1		
	<i>Pt</i>	CAO99188		
	<i>Cp</i>	jelen munka - részleges		
	<i>At</i>	NP_564904		
	<i>Vv</i>	XP_002272055		
	<i>Sl</i>	AAV22055		
	<i>Os</i>	BAC83202		
	<i>Zm</i>	NP_001105860		
DMI3	<i>Mt</i>	Q6RET7	GenBank	DS982700; DS981574
	<i>Ps</i>	Q6RET6		
	<i>Lj</i>	A0AAR7		
	<i>Cs</i>	Cucsa.364320.1		
	<i>Pt</i>	XP_002315401		
	<i>Cp</i>	jelen munka		
	<i>At</i>	NP_187677		
	<i>Vv</i>	XP_002273342		
	<i>Sl</i>	jelen munka		
	<i>Os</i>	NP_001055895		
	<i>Zm</i>	NP_001105906		
IPD3	<i>Mt</i>	ABN45743	GenBank	NC_008469 DS981610
	<i>Ps</i>	ABU63669		
	<i>Lj</i>	ABU63668		
	<i>Cs</i>	Cucsa.322360.1		
	<i>Pt</i>	jelen munka		
	<i>Cp</i>	jelen munka - részleges		
	<i>At</i>	NP_565355		
	<i>Vv</i>	CAO66714		
	<i>Sl</i>	jelen munka		
	<i>Os</i>	ABU63670		
	<i>Zm</i>	ACR37710		

NSP1	Mt	Q4VYC8		GenBank	
	Ps	na		na	
	Lj	ABK35066		GenBank	
	Cs	jelen munka		GenBank	ACHR01005097
	Pt	XP_002299589		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_25.124		Phytozome	
	At	NP_188000		GenBank	
	Vv	XP_002273108		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02002324
	Os	AAP12983		GenBank	
	Zm	jelen munka		GenBank	AC214506
NSP2	Mt	Q5NE24		GenBank	
	Ps	CAH55769		GenBank	
	Lj	BAE72690		GenBank	
	Cs	jelen munka		GenBank	ACHR01004706
	Pt	XP_002306621		GenBank	
	Cp	jelen munka		GenBank	ABIM01009445
	At	NP_192565		GenBank	
	Vv	XP_002284426		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02005299
	Os	AAP06856		GenBank	
	Zm	jelen munka		GenBank	AC212193
ERN1	Mt	ABK28850		GenBank	
	Ps	ABQ85893		GenBank	
	Lj	jelen munka		GenBank	AP006677
	Cs	jelen munka		GenBank	ACHR01011247
	Pt	XP_002319156		GenBank	
	Cp	jelen munka		GenBank	ABIM01011968
	At	NP_197480		GenBank	
	Vv	XP_002281619		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02013796
	Os	EAZ03158		GenBank	
	Zm	ACF85420		GenBank	
NIN	Mt	ACN58567		GenBank	
	Ps	CAD37948		GenBank	
	Lj	CAB61243		GenBank	
	Cs	Cucsa.272130.1		Phytozome	
	Pt	jelen munka		GenBank	NW_001492762
	Cp	jelen munka		GenBank	DS981540; EX272530; EX258855
	At	NP_195253		GenBank	
	Vv	XP_002279578		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	CU326379
	Os	NP_001048860		GenBank	
	Zm	GRMZM2G109509_T02		Phytozome	
CRE1	Mt	jelen munka		GenBank	AC141922
	Ps	jelen munka		GenBank	DQ845485
	Lj	ABI48271.1		GenBank	
	Cs	Cucsa.368940.1		Phytozome	
	Pt	XP_002314765		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_2.143		Phytozome	
	At	jelen munka (BAB33310)		GenBank	AB049934
	Vv	XP_002285117		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02000564
	Os	FAA00250		GenBank	
	Zm	NP_001105858		GenBank	
LIN	Mt	ACL14419		GenBank	
	Ps	na		na	
	Lj	ACL14423		GenBank	
	Cs	jelen munka		GenBank	ACHR01000793
	Pt	jelen munka		GenBank	NC_008471
	Cp	jelen munka		GenBank	ABIM01007354
	At	AAF26992		GenBank	
	Vv	CAN74785		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02024187
	Os	NP_001042489		GenBank	
LIN(h)				GenBank	
LIN(h)	Zm	jelen munka		GenBank	AC195255

LIN2	Mt	jelen munka	GenBank	saját szekvenálás
	Ps	na	na	
	Lj	jelen munka	GenBank	AP007953
	Cs	jelen munka	GenBank	ACHR01005692
	Pt	jelen munka	GenBank	NC_008484.1
	Cp	jelen munka	GenBank	ABIM01006734
	Vv	jelen munka	GenBank	AM477972
	Sl	jelen munka	GenBank	AEKE02004453
LINh	Acv	jelen munka	GenBank	saját szekvenálás
LINh1	Sm	XP_002972675	GenBank	
LINh2	Sm	XP_002978658	GenBank	
SUNN	Mt	AAW71475	GenBank	
	Ps	CAD42181	GenBank	
	Lj	CAD42335	GenBank	
	Cs	Cucsa.343120.1	Phytozome	
	Pt	XP_002307734	GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_26.309	Phytozome	
	At	NP_177710	GenBank	
	Vv	XP_002279563	GenBank	
	Sl	jelen munka	GenBank	AEKE02013256
	Os	NP_001058593	GenBank	
Zm		jelen munka		AC209026
KLV	Mt	XP_003618726	GenBank	
	Ps	na	na	
	Lj	BAL04590	GenBank	
	Cs	Cucsa.397770.1	Phytozome	
	Pt	XP_002305358	GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_14.179	Phytozome	
	At	NP_186862	GenBank	
	Vv	XP_002279979	GenBank	
	Sl	BAK52396	GenBank	
	Os	jelen munka (NP_001060207)	GenBank	NC_008400
Zm		GRMZM2G017409_T01	Phytozome	
RIT	Mt	ADM22319	GenBank	
	Ps	jelen munka - részleges	GenBank	GH720473; FG529463
	Lj	CAQ17051	GenBank	
	Cs	Cucsa.332770.1	Phytozome	
	Pt	jelen munka	GenBank	NC_008478
	Cp	evm.model.supercontig_30.159	Phytozome	
	At	NP_001031485	GenBank	
	Vv	XP_002276461	GenBank	
	Sl	jelen munka	GenBank	AEKE02000960
	Os	jelen munka	GenBank	AK071354
Zm		jelen munka	GenBank	AC198420
PIR1	Mt	jelen munka	GenBank	AC146587
	Ps	jelen munka - részleges	GenBank	FG537344
	Lj	CAQ17050	GenBank	
	Cs	Cucsa.397340.1	Phytozome	
	Pt	jelen munka	GenBank	NC_008479
	Cp	jelen munka	GenBank	ABIM01011901; ABIM01011902; ABIM01011903;
	At	NP_974801	GenBank	ABIM01011904; ABIM01011905; ABIM01011906
	Vv	jelen munka	GenBank	
	Sl	jelen munka	GenBank	NC_012010
	Os	EEC74503	GenBank	AEKE02005304; AEKE02005305; AEKE02005306
Zm		jelen munka	GenBank	AC194145; AC196180

kontroll szekvenciák				
RBCL	Mt	YP_001381744	GenBank	
	Ps	YP_003587524	GenBank	
	Lj	NP_084780	GenBank	
	Cs	P27064	GenBank	
	Pt	YP_001109509	GenBank	
	Cp	YP_001671691	GenBank	
	At	NP_051067	GenBank	
	Vv	YP_567084	GenBank	
	Sl	YP_514860	GenBank	
	Os	NP_039391	GenBank	
Zm		NP_043033	GenBank	

ATPB	Mt	YP_001381743		GenBank	
	Ps	P05037		GenBank	
	Lj	NP_084781		GenBank	
	Cs	YP_247606		GenBank	
	Pt	YP_001109508		GenBank	
	Cp	YP_001671690		GenBank	
	At	NP_051066		GenBank	
	Vv	YP_567083		GenBank	
	Sl	YP_514859		GenBank	
	Os	AAM08603		GenBank	
	Zm	NP_043032		GenBank	
MATK	Mt	AAM82101		GenBank	
	Ps	Q5YJU1		GenBank	
	Lj	NP_084779		GenBank	
	Cs	Q2QDA7		GenBank	
	Pt	YP_001109481		GenBank	
	Cp	YP_001671664		GenBank	
	At	AAG43341		GenBank	
	Vv	YP_567057		GenBank	
	Sl	YP_514833		GenBank	
	Os	P0C381		GenBank	
	Zm	P48190		GenBank	
G6PDH	Mt	XP_003622423		GenBank	
	Ps	ABI97284		GenBank	
	Lj	AK339717		GenBank	
	Cs	Cucsa.357550.1		Phytozome	
	Pt	XP_002323796		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_130.39		Phytozome	
	At	NP_198892		GenBank	
	Vv	XP_002266527		GenBank	
	Sl	AK326094		GenBank	
	Os	NP_001047345		GenBank	
	Zm	ACN34086		GenBank	
MAG1	Mt	ACJ86082		GenBank	
	Ps	jelen munka - részleges		GenBank	AM162165; FG538039
	Lj	AFK38380		GenBank	
	Cs	Cucsa.197600.1		Phytozome	
	Pt	ABK95199		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_388.5		Phytozome	
	At	NP_974399 (AT3G47810)		GenBank	
	Vv	XP_002277517		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	DB691202
	Os	BAF08413		GenBank	
	Zm	ACG28553		GenBank	
AGT1	Mt	XP_003600159		GenBank	AM162083; AM162109; FG537526; AM161692; CD859047; CD859061; CD858645; AM161648;
	Ps	jelen munka		GenBank	CD859077
	Lj	jelen munka		GenBank	AP009646
	Cs	ABQ81922		GenBank	
	Pt	EEE87326		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_892.2		Phytozome	
	At	NP_178969 (AT2G13360)		GenBank	
	Vv	XP_002279236		GenBank	
	Sl	AEW69795		GenBank	
	Os	NP_001062170		GenBank	
	Zm	ACG30854		GenBank	
DH	Mt	jelen munka		GenBank	BI308353
	Ps	na		na	
	Lj	jelen munka		GenBank	FS326465
	Cs	jelen munka		GenBank	ACHR01007364
	Pt	EEE99450		GenBank	
	Cp	jelen munka		GenBank	EX266712; EX262387
	At	AAP21224 (AT2G32520)		GenBank	
	Vv	CAN60148		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AEKE02009264
	Os	EAZ12194		GenBank	
	Zm	ACG32282		GenBank	



EIF3K	Mt	ACJ83269		GenBank	
	Ps	jelen munka - részleges		GenBank	GH720324.1
	Lj	AFK42050		GenBank	
	Cs	Cucsa.142070.1		Phytozome	
	Pt	XP_002326147		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_82.63		Phytozome	
	At	NP_195051 (AT4G33250)		GenBank	
	Vv	CBI27753		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AK326619
	Os	ABF94327		GenBank	
	Zm	ACF82828		GenBank	
ATPQ	Mt	XP_003591975		GenBank	
	Ps	jelen munka		GenBank	FG529564
	Lj	AFK35709.1		GenBank	
	Cs	Cucsa.308200.1		Phytozome	
	Pt	XP_002312034		GenBank	
	Cp	jelen munka		GenBank	EX273330; EX290943; EX260447; EX266386; EX268650
	At	NP_190798 (AT3G52300)		GenBank	
	Vv	XP_002277452		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	BT013973
	Os	BAD09007		GenBank	
	Zm	NP_001150316		GenBank	
TAFII15	Mt	XP_003624232		GenBank	
	Ps	na		na	
	Lj	jelen munka		GenBank	FS342314
	Cs	Cucsa.163030.1		Phytozome	
	Pt	EEF02925		GenBank	
	Cp	jelen munka			ABIM01006702; ABIM01006701
	At	NP_849481 (AT4G31720)		GenBank	
	Vv	CBI22350		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AK325043
	Os	jelen munka		GenBank	BE041013
	Zm	jelen munka (ACG26535)		GenBank	EU954417
ATP7	Mt	ACJ84049		GenBank	
	Ps	na		na	
	Lj	jelen munka		GenBank	FS325766
	Cs	Cucsa.101520.1		Phytozome	
	Pt	XP_002310038		GenBank	
	Cp	evm.model.supercontig_72.4		Phytozome	
	At	NP_179778 (AT2G21870)		GenBank	
	Vv	CBI21525		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AK320017
	Os	BAD07747		GenBank	
	Zm	ACG34902		GenBank	
RRMP	Mt	jelen munka		GenBank	EY474783
	Ps	jelen munka - részleges		GenBank	EX570397
	Lj	jelen munka		GenBank	FS321118
	Cs	Cucsa.364800.1		Phytozome	
	Pt	EEF02684		GenBank	
	Cp	jelen munka		GenBank	EX257977; EX273866
	At	NP_196080 (AT5G04600)		GenBank	
	Vv	XP_002277092		GenBank	
	Sl	jelen munka		GenBank	AK322263
	Os	BAC99692		GenBank	
	Zm	ACG32390		GenBank	

**10.1. táblázat.** A dolgozathoz használt fehérje szekvenciák egyedi azonosítói. A jelen munka által végzett kódoló szekvencia predikciókhoz felhasznált DNS szekvenciák azonosítóit az utolsó oszlopban tüntettük fel. Ahol szükséges volt, a predikciót megelőzte az adott DNS szakasz összerendezése genom DNS illetve EST szekvencia darabokból. A szekvencia összerendezéshez és/vagy génpredikciókhoz használt DNS szekvenciák csak a jelen munka által prediktált géntermékek esetén láthatóak. A negyedik oszlopban színek jelzi az adott szekvencia minőségét: piros - teljes szekvencia elérhető az adott genomban, kék - csak részleges szekvencia érhető el az adott genomban, szürke - szekvenálási hiányosságok miatt nem érhető el a homológ szekvenciája az adott genomban (na - nincsen adat).

Mt mutáns	Lj mutáns	promóter	transzgén		komplementáció			forrás faj		referencia
			szekvencia		Nod	Inf	Fix	növény kiád	N köt. mik.	
Mtdmi1	Ljpollux	p35S	OsPOLLUX	kódoló	+/-	-	-	Oryza sativa	-	(Banba et al., 2008)
	Ljpollux	pLjPOLLUX	OsPOLLUX	kódoló	+/-	-	-	Oryza sativa	-	(Banba et al., 2008)
	Ljcastor	p35S	OsCASTOR	kódoló	+	+	na	Oryza sativa	-	(Banba et al., 2008)
		p35S	OsPOLLUX	kódoló	+	-	-	Oryza sativa	-	(Chen et al., 2009)
	Mtdmi1	p35S	*AtPOLLUX <sup>S237A</sup>	na	+	na	na	Arabidopsis thaliana	-	(Venkateshwaran et al., 2012)
Mtdmi3	Ljsymrk	pLjSYMRK	CgSYMRK	kódoló	+	+	na	Casuarina glauca	+	(Gherbi et al., 2008)
	Ljsymrk	pLjSYMRK	DgSYMRK	kódoló	+	+	na	Datisca glomerata	+	(Markmann et al., 2008)
	Ljsymrk	pLjSYMRK	TmSYMRK	kódoló	+	+	na	Tropaeolum majus	-	(Markmann et al., 2008)
	Ljsymrk	pLjSYMRK	LeSYMRK	genomi	-	-	-	Lycopersicum esculentum	-	(Markmann et al., 2008)
	Ljsymrk	pLjSYMRK	OsSYMRK	genomi	+/-	+/-	na	Oryza sativa	-	(Markmann et al., 2008)
Mtdmi3		p35S	LICCaMK	kódoló	+	na	na	Lilium longiflorum	-	(Gleason et al., 2006)
		p35S	OsDMI3	kódoló	+	-	-	Oryza sativa	-	(Godfroy et al., 2006)
		pMtDMI3	OsDMI3	kódoló	+	-	-	Oryza sativa	-	(Godfroy et al., 2006)
	Ljccamk	p35S	OsCaMK	kódoló	+	+	na	Oryza sativa	-	(Banba et al., 2008)
Mtnsp1	Ljcyclops	pLjCYCLOPS	OsCYCLOPS	kódoló	+	+	na	Oryza sativa	-	(Yano et al., 2008)
	Ljnsp1	pMtNSP1	NbNSP1	kódoló	+	+/-	+/-	Nicotiana benthamiana	-	(Heckmann et al., 2006)
		pMtNSP1	NbNSP1	kódoló	+	+/-	-	Nicotiana benthamiana	-	(Heckmann et al., 2006)
	Ljnsp1	p35S	OsNSP1	genomi	+	+	+	Oryza sativa	-	(Yokota et al., 2010)
	Ljnsp2	p35S	OsNSP2	genomi	+	+	+	Oryza sativa	-	(Yokota et al., 2010)
Mtrit	Ljnin	pLjNIN	OsNLP1 (OsNIN)	kódoló	-	-	-	Oryza sativa	-	(Yokota et al., 2010)
		p35S	AtNAP1	kódoló	+	+	na	Arabidopsis thaliana	-	(Miyahara et al., 2010)

---

**10.2. táblázat.** A szakirodalomban elérhető transzkomplementációs kísérletek összefoglaló táblázata. A táblázatból kiolvasható, melyik pillangósvirágú modellnövény milyen mutáns egyedein folytak a komplementációs kísérletek. A komplementáló konstrukciót illetően feltüntettük, hogy a konstitutív expressziót biztosító dohány mozaik vírus 35S promóterét, vagy valamely pillangósvirágú (*M. truncatula* vagy *L. japonicus*) szimbiotikus gén specifikus promóterszakaszát használták meghajtó elemként a kísérletekben. A komplementáló transzgén nevén túl feltüntettük, hogy kódoló (CDS) vagy intronokat is tartalmazó genomi DNS szakaszt használtak a konstrukciókban. A forrás fajként a konstrukciókban transzgénként használt szekvenciát eredetileg hordozó fajra hivatkozunk, melynek rendszertani besorolása mellet, látható, hogy képes-e nitrogénkötő (N köt.) vagy arbuszkuláris mikorrhiza (mik.) szimbiózis kialakítására: (+) képes, (-) nem képes. A komplementációs kísérletek eredményeként feltüntettük, hogy megfigyelhetőek voltak-e a komplementáló konstrukciókkal transzformált kísérleti növényeken gümők (Nod), azokat képesek voltak-e kolonizálni a szimbionták (Inf), illetve a gümők képesek voltak-e nitrogént kötni (Fix): (+) sötét zöld háttér - gyakran, (+/-) világos zöld háttér – ritkán/részlegesen, (-) piros háttér - soha, (na) fehér háttér - nincsen adat. A kísérletek bővebb leírása a referencia közleményekben olvasható.

---

---

**10.3. adat.** A dolgozathoz felhasznált szekvenciák. Csak a szakirodalomban még nem közölt DNS (p - promóter szakasz, g - genomi DNS, c – kódoló DNS) és fehérje szekvenciákat mutatjuk, FASTA formátumban.

---

>pMtLIN2

cttccacactaaacaccataagcatttgaatgaggacaaaatttatctccaagaaggagactaatacgtttatgttatctctcttctatgtgttc  
ttcatacaaaaacaaaaatccatgtttcagaacatggtacatgacaataaaccatgatgatcgaatattcaaaatcgtaggcaatctcattt  
cattaaattcttaagcatgatgtataatgtaaaccacaaaacgaagtcacctaattatctacaatcaagttagtataatagcaattgtccaagt  
accatttatgatgcatctaaaattaaattaccaaatacgtcatggaaaatcaatttacactgacatttccagagacttaaacgaaaaagaataa  
actatattttctctcgtcatatttataagataaaattacgttttatattcattaaatacttaatttttagtctataatataatcaagtcacattatgtattca  
atgaatctaaaaagtagtattttattataaataatgattagaggagtagtagactaaattaaaaatgagtatcataagaacagaaacgaatcaaa  
gaaaaaaaattgcaaaatgactatgatacacagaatgtttaagcttgaatttaactataagaaaaacaaaattccatttgaatatattgtttgtg  
catccatcaatcatcatgaggtaaaaacgtctccttcttaaaaaaaaataatagaggtaaaaacgtcaactaatctatatttaattgtcctg  
taaatacgggtcagctgatggttataagattaataatggtctgtgtgtgtgtgtttttaagaaaaaaaatctatttttaattaaaaatcactttttta  
ttttgtgtgtgttttagatttttaaaaaatctatttgttttaaaaaatacatttttagcttcaaaatgaaaagtattccaagtaactattcaataca  
aaaacaaaaaattaaaaggaaactcaaatgtaagagcttcaaatcttaaaaaataattttataatagtaaacaaacagaaataagcttcagatttt  
tttaaaatttctagattttttaactcataatctatatttttaagctaaaacacacacataatatacaaaagatcaaaagttaaactcctcaatttctca  
ttcctccagcatgtagtcagtcatttaataactactccatccgttttaaaatgagtatcgtttaatacaaaaaattgtttcaaaatgaatatca  
ctttcagtttcaatgcaataataactttttttcaattgtacccttcaattaatactacgttacattactttcaaaagtattttttcttaataaaaaac  
aaactaatagttgattagataatttggtaaaattgatatgacatttgactacttttttcttcatttaatatgtgtgaattgactaaagcgacaccc  
atttgaaacggatggagtagttttctcaaaaaaaagtcattaacaattttaaaaaaattattaacttaaatgaagttggacttataccgaaaa  
aaaattaactaaataaagttgaacttgcaaaaagttccagcaaaaaaactactactacatcgataaaaataacaataagaaatgatctctgc  
caaatcaaaagcatgaatccaaaatccagaaaccgcatgacgtgattaacagtcacacccgagccggctggccggcaaaacgggtcccac  
ttgttcatttttggccgacatttcaaaagttgtagattaccaaaatatccactcttttagtcttacttattccacttggaaacttgtcttctgcacat  
ttttttattacataacaaaaccatgatcaatacatgtttaattgtttaattacttagacaaaaaacttggcgtcatttcaaatatgggaatgtgt  
ttttctgactaattattagtattactttcacataagggtgaattgtcatttcaaaacttggcgtccggtcagagacttctgtcccgcaaatg  
aatcagttaatactgtttattcccgttaacatcgctgtaaacctcatttcaactcattccattccgatcaaaaaccaccgccc

>gMtLIN2

atgaacacaacagaaactcaaatcctccgttacactaccgcattcatcaccggcggtattcatcaatcacaaactccgtcgccacctcattgaaa  
ctctccaccgagaaactccaatcaccaatcaagtaaccttaaaacaactcaacctcgcctcagaagctctcgaaagcgccgtttccaactcc  
agctccgcatcctcgtctctctctctctcctcgcggagaaacttctccttctctcctgagtagtctcttctcctcctcctcctcctcattcaa  
accctccgtaaccacgcccgaagaatcgccatcattctcctcagaatcttctcctcaatccttcaactcgtcgtgatctgaaatagcaccgtctctc  
tacgagcatctttttgtttcatctcaccctgtttccgatggttcgatgaacagagaacacggatttggccatccgcttctgaaactccgagcc  
gagacggagacacccggtgactactctgtttccaacgatttgtttatgccttatgcaaagtgttatcgagtgtgagcagtgatcaagcgtaaag  
ctgaaggagttgagaaggagtagcgaagaggttttgatgagaattgcaggggtcttctgtgtattttaagaggttttggtgaataaagatg  
aagattcgacgattagtcaccggttgtgatcttgaagaacgctgcaggaagtgagcagcaacgaccgtggtggattgcatagaaaggagga  
aatgaaaaatgcctcagttggagaacggacgggtataatgtaattgttccttgatgttattgtttacgaatttatacttttcttcaattcaactacaa  
atgtttatgtttgtgtgtaatttcattgggttcgttcaatttttatcaactgggatttaacataaaagtgaacctaaagattgatttctgtgcttcaa  
ctcagtggttggaaggatttgtttgtttctgttaattttctagaatgaagttacaagaattaggtcaattttggaaattttattggcctctttgattt  
taattaaggcctcctgaaatttaattggactgctcaaaatttgcgtgttagttgtttgtcatatagtcaggtccgtgattttctccggtaccaacg  
gatgacttttgttggtgacatttgtttcctataatagctagaaaacaaaattgtattgcactgaggtgtgtgattggcgtagctaggtagaa  
aggaaaatgtgatttgagagaaaactaggagtttcttgcatttttggttgatggtttaacgcacatgcatttcatgacatttctcatttcttctc  
cttttctattgattcctgcagccaatgtggtccgaaaaggatacatcagttgaattttgagcagcagttcgagcagcatatctcctcctcgcgt  
gttatatcctcaaaagagctctcctcaagagtcctccatcccctaaaatcttcaaaaatttggacaacaccagcctattttaaactcagcccctgaaa  
ctcaattttcttagatgagaatttacttggcttctcctcgattctgaagctgaaaatgaggttaattgatgccactaagaacgggaaaaccaatg  
aggactgaattttctatgcttctgttttagtttttagtgctaaagtgaatgatgctctgtaggaaaaagacaaaaatgtagcattgttgagacc  
tcgacaaagccaaagccaaaacaaggaacaaattcaaacatcttcaagaatccaggggtacgtatataaaaaaccattcttcaatatttt  
gttgtctgatgcattttcttaacttgatttctcctgctcctagctccccagattatccaatggcagactatgaaaacacgccgccacatggaag  
tgaggaaacaaacacctcctaaagacttgcctgtccaataaccagtaacataatttgatgatccagtgactcttgagactggtcagacatatgaa  
cgtaaaagctattgaggaatggttaataagagagaacataacttgcctatcactcgccagaagctacaaaacaccaagctaccaaaagacaaa  
ttatgtgctcaaaagactagttgctagctggaagaacacacacccagttcagtcctcctacatgtgagtgccatacaaaagatagcgagtc  
agtagtgaagacagaaataaccttcaacttctcctaatagtgtcataacacaggccactgttgatgggatgattggcgagttacgctgtgcaatc  
aataacctgtacatgacagagattctccaggaatctgaaatggcggctcttcaaatagagaaattgtggagaggagggaatctgggagtgga  
tatccacagcatgctatcaaaacctccaattattaatgggtttgtggagatactttcaattctgttgaaccccggttcttcaggcagcagtttcc  
ttctggctgagatgggatctagagacaattctgttattcagactctaacacgcgtggataccgacgttgaatgtataatggctcttttcaagaaa

gggttgacagaagctgtgtgctattgtatgtcctaaacccatccactgtgactcttactgagatggccgtagtagagtcctcatagccgtttc  
aataagaaagaggaagacttggtaacatgtgttaaatccaaaacagctgcagttcttctacttggacagattattggaagcagtgatgaga  
taattgcactctcgattgtcaagactttgtctctgaaaaagcacttggagctattgttggcagtttaggagctgaatgggcagaggagaggatt  
gttgagtgagatcttattaagatgcatgcaagaggatgggactttaggaacaccattgctgacaaagcagagctctcttattatggag  
agcttcatccatgcaaatgatgcagaacgtttcaagattgttgaatttttctgagttgatcaagctaaataggtatatctatctgttccgtattcgg  
gattatgctaaccaaactagtagctagcttttttgtaaaagagagtatctagtagctagctaatgtactaaatagaactggtttaagaagatta  
agaaaatggaaaaatattttttaaaaaacacaaaatttgatgcattgataacatcaaatagtaaagttaactactttccatctttattcttaacaag  
tttagacccttccatagattttgccatcaaactaatgtacttttagtttatctgatagtttcaattgggtccttccaggagaacattcaatgaaa  
gaatectccatattataaaggaagaagggccttttagtacaatgcatactcttcttattcatttgcaaacagcccttcaagatcaatgtccagtc  
ggccggtctcttactccaacttgatcttctggtatgaatcttggaaatctgatactagtagctaaatcttaaaaataggaactagttatgatttct  
atttactcttctatattactacctttaaatacaacacaatgtgctgtttccagttatagagttaacaccgctcatgccatttttaggtgaacca  
agaaaatagagcatataccgtgaagaggcaatagacagcttatttcatgcctgaggaactcagatttccctactaccagtttagcagctgctg  
atacaattatgtcactgcaagggaggttcagcttctctggaaagcctcttattagagaagtccttcttaaacgggcccgtattgacaaaggtcc  
cagaagtgtatgtcaggtggatcatatgagcaacttctctcagaatcgaaataactgcagtaattgttcttgaacttttaagattttttagt  
ttctgttttctgcttccaggacattcctatttttagctttttgttgttgggtgtctatttttaaaaatattgttatatactcggaatcaataggaag  
aagagagagcagcagatgattgggaagaaaaattgcactgttctagttagccacagagtttggatacttttgaagctttggcagatggcat  
gaagagtagaattccagagctacgttcagcatgctttatcatcagctacgtggctcatatacatgctgaccactctaccagatacagggatacaa  
ggagcagcccgtgtctgtttgctaaagccgttcgtaataaattaaattctgtaaggatatagaacacagaatcctttctatgcttgccttaata  
gctttcttatttctgtgtaagttcagaacccagccaattattacaaccttgatttaataatttagaacagctagatgataataataataaat  
aaataaaatattttctacaaaggaaaatatcatcggttttttagtttctgtaagcatcataaattactcatacagaattcaatagatttagataagatc  
ttattattttggcttctctatattagctattttgaaaagtataaaatatttggtgaacctatgagcctctctgttgattatgtgttcaaacttatgcat  
gccgtttatgaaaatcagcaatatgatgactgtactgtatgttaatttcagatggcttacgtgatctaactgcttctacgctaaggatatctta  
aaaggtttgagagagctaaagagattctctcccttggcatctgaaatgctgaaagttctggtgatgagaatgagcctaaacagtaagtttgg  
tgtattcctaaaccatttttagtataggcatggtattggtggattatctaaattcttcatcggaacaggatatttgagacataaagagataatcc  
aagtagattgcagagggaatggagacgtgctgtctgtcattgttcaaggataaaattattcaggccataccgatggcagcatcaaggttaa  
taaaatttaggatttcaaatgccgttttaattctaattgttcatgattacagttattgaaacaaactataacttttattagcactctggcagataataga  
tttctattttatctgttatagttgtttacatatttttctttaaaccaccagaaaataaattaccgcagactgaaactctccatttatgcaattaccta  
gaggagacttgggtgtgtgagcatgagctagatacattagaaaatagataagattagggtgtgcaaaaaggagtaaatttttatgacaaggt  
gtttgccatttaccttaagattcaatagctttaaataatgccaggtcatatttacctggctcattagcaaatgtttgatccttggctgtatatgacaa  
ctttaccgtgatagagcttactggaaaatactttgaacttttgaaggtctggacattaaaggataacgaattacttctgttgcaagagatccaag  
aacataccaaggctgtgacaaactgacgatttcagaacctgggtgacagactttacagtggttcacttgaccgaactgcaaaagttaaatttct  
tgacgtctagtttcaatgtcagacagcctgctaaacaaaattttgttctgtgaataacagatctggtctattggaaggcagcaatacattgt  
gagcaggtgcatgatataaggaaccagattcataatttagttgtaaccaatagcacaactgtttcattccgcagggggctggtgtcaaggta  
cgccatacgcatgcaaaattaaaaataacactacttccctctcatcatcaatgcctacttagtaatctcagacatgaacattatacttttagctgg  
atgatgatgtaccgttcttctctatctgatttagtatccaaaaactaaatccctaagtggggatattgacaagtcacagtttccgaacagattt  
gcttcttcttcatcttcttccatctaattgattacaattagttcgtttaaattaaactaaagcaagtaacattattgtgtgccgttaattacttttctt  
catcaggttcagtcattgaatggagaatccaagttgttaaattcaataaataacgtgaagtgttggctcatgctcatggaagattatactgtgg  
atgccacgacagtagtggtcaggtatcaagtttaagaagtacgacatagcctaaatccaatgtgatgctatctcaacttgagtagtgatgttat  
ctcgacatattgtgataatattattgcatatttcaggagatacatttggccactggaactatcagtaattcaaaagtgttctaaaagattacttg  
ggaaagcatatcctattcatgactgcaagttcatggtgaacttatatgcagctggctcttcttggatggaactgctataaaggatctcaca  
catatatggtttgtgttatataaataacttaattcttctgtagaaacatcaggtttcatgatattgaattctaaatcatagaaattatttgacttctt  
tgatattaacttttctggatgttctgaccatagtttaactgactgtttacatatacgtcaagatatggaataattccaattacagcatggttggatcact  
gcaaaactggatcagaagtgcgggctatggcagtgagttcagaattaatttttgggggtgcaaggagggtgtgtagaaatttgggataagaa  
acacattaaagtggcacgttacagttgggtacaaaattgtaaggtaattgcatggctctagacagcaatgaacaaaatttgggtattggaactt  
cagatggacaaattcaggtgacaaaaatttgcgttgaagtttaatttcaaatggttatattatattctcatttcacgccttgatgtagcatagcacc  
cttttctccaaatctacaatgatgatagattgaggggttggccaaactttcatattacaaaagtttgcatttttttttggatcaagtagtctagtg  
acagagaaaatcaccttaaaatgaataagtgggggtgtccgggggtcgaaccccagcccttcatatattgtgcattatcccttaccaaatgagc  
taagctcggggacaaaagtgttgcataatttatgtcatgtatataccaaccaagtagcagttttactctgtcttctaaatcatatataaataagaactgt  
aatagtagagtttttttttactaaaagtgacaatttctggtattgcaggcttgggaaatgaattaa

>cAcvLINh

atgactctgcaggttccctcgagagtgatgacgccgtgttgaacgagttgatcgctgtggttggaaagtatacattggatgctctgcttgaca  
cagagcagcggcgacagcacaaggagttgtgtgcagaacggcttgcgcccgaagacaatgttgaggtgcaatagcggagcagggcgt

gttggcgaacttgactggggaatggatgccttgaggaagccatcatgacatctaataagagaccaagaaggcaaggctggagcatg  
cagagaaaatgctgcaagtgagtgctctctgaacacacgccacacaacagctggcgtgcccaactcctacctctccgctgggctcacct  
caatctggctttgtgtcgaagcttctgatgatgactgcaaagcagctgccacatcctggagatgttctttagagccattttatgctagag  
ttgattttgcccctccctctgggaaaagctcttctgtcacatctcacttccatcctaggtggtactcagagcagagacatcagattattgcatc  
cattttaccagacgggtacagattattcatggtcaaaagacgagctctcatataatgttgagagataagaatttctctcaatccttggccctga  
gcaggtttgaaattgcagcaactggagcaggtatatcaggactctcttgatgagaatacaaggctgtacgcacgggtattacaaggaatggg  
tgaatctcgatccgagagtgagcccgaagaggaacatgcctctcatgccaaattgcagagccacccatgactccaacccgagaactgagcc  
acctgccacgggcatttaagtttgaccgcagccaccaaccagtgtctgggtctctcattctcatagtgttttctccactgtctacaacaccagt  
gataaccaggttactctcaggggaaggcccgatgcttattgtggcatgactggcactcataaccaatgtgggatgtcgtatgaggagtctcaa  
atatctgaaggcggagcagcgcgtcatcacatatggcatggaattaccgcaagtgggtgaggcattcccccttactgaccagtctccgggag  
agcattttgtctctgcaaagttcagaagaaagtagtcttagtgcaagagggcagtcagatggccgtggaattgggcatcaatcgccaattgaat  
ctcagatatctgagaaagacagccgcaagacctctcaaggattcatgcagaaagccatcataaaacacgtagctcaaatgcgctatcgaca  
ctctccaagatcaagacactgtcgtgtgtttcttctcaggtcatcaccaattatccagggcggttctgtctccgactccagattgaagac  
tgttgagaattttgtctctcacgacatagctctgggatcacatgccatggcaaaaacaaagaagacagttaagcttgaggcagggcgga  
gaatcagatggaatgatgaacgtgtgtttcagaagaggcaattcaagatgaggggcagcaaaagactcggactaaaaggagatcgaaa  
tcaaggtctcttgcaaaaagcccggcagattttgaacaaatggtcacgggcatactcttccaattgacacttctgatatctcaaccctgc  
aacaaggccacaaaagattttgtttgtccatcactagccaaattttcaatgatccagtgtacgcttgaactgggtcagacttatgaaagaaag  
gcaatccaagaatggctggatagaggcaacacaacttgcccaattacacgccagactttgcagagcttatcttccaagacaaactatgtc  
ttgaagagggctcattgcaagctggaaagagcagcatcctgacttggcattggaatatggatcatcgaaaactcaccttgtgttctcggact  
caacaaaattatctgcttcaactgggtggaccttatgatcaaaagcgtgttagaagcaagtggctcccaaacggctccttctcacctagcagca  
tcacaagcagcacaagagtaggcaaaagtcagagaaccaatggatcatggtatgctcgaattcttctacaaggactgaaatcagtcaaaagt  
gccaagagactttgattgacgagcttaaacctgcgggtggtctgtatttgcctctgacgagctgcaggagtgtgaagcagctgtcttcaa  
attgcacgagcttgagggaatccaaaggtgtcaagcgtccaggtgcatttgggtcaagctgaaatgcttaagaccttatggaggtgctt  
tccatctcaacaatgcagaagttctgaagcagccatttacattttgcagagcttatcacagagagacgagctgtgggtcgggttagtgcagt  
agaggatcccagctacgaattgttattgggtcctgaagaggaagatacctagctctgcagtttattgtatcaactggaaccgctgttatcgc  
aatctgtgggtctgacctccttcttattgatggacgttgcataagtgtgaacatgagagtgtgcgatcaaaaaccagtatcagatgttct  
tgggacctaaaggagctgcttctgtgatagataaaaattgtgacatntgcggaaacacagctcaaaagtctgactcgtcatggcatcatc  
tatggatggctcttctccacttggatagctgtggaagcagctagcatgaaggaaaggatcagtcgggtctccattctgctatgttgatgcagg  
ccgatgggaagtctcgagctatattgccatagctcagctaaactccagtttggaaattgtgactgtgataatgaaagaggaagacatg  
ttactatctgttcttaacagaatttagtcaggctaagcaggtcaatcaacaaccagcttcttcaggtataaaggatgaaggatctctcagcaca  
atgcatgtcctgctgtacgtcttcagaaggccccttcgagcaacgtcccttcattgctggcttcttctcaactgacctattgataaagccc  
aaaaagggcagtatgtaccgggaagaggcgattgaggcactcatagaagcgcttgaacaaggatagctcagttcacaagttgcagcag  
ctgaaacgctcgttgccttaggtagcaggttcttcttctggaagatctctttggagctctccctgctgaagtcggccgggcttgagcaaggg  
ctcaaaagccgtgtgaaggaggaacaatcactacaaaaaccagctgtgccagacggcatcctgcaggaaaatagagtagaggaggagaa  
ggcttgcattggaatgggagagacgtgtcgcaggagctctgttaattttgaaaatggcttgatattgaaggcttataaagggatgaagagc  
caacctgtggcattatcaaaaccatgtaacatagcttcaacttggcttgcacatgttgccttattgcccatactgggtccaagataaagc  
atgcaagattttgatgccagagtatttcgcatcctcaaatgtctaaagttactgaggagaaggcttttagcagtccttgccttgcacagtttgtt  
gatgactcaggactgcaagaactgtacagcgtgcaaatgacataagtggacctttagggcagctcagaagctcatcaaaaatggcaagca  
caatactgaagaaactaattagcagtccttctgtaaatgtgcctgaacttgggcccagaggaaatagctcctccattgatgcaggggtgaa  
tgagagaggtcaggtgtcttgcagattgcaggaaggcttttagtgggcatcagatggaagtatgaaggttgggatttaggaagaagaa  
ccttattttgattcaagacctaaagagcatcagaaatctgaacatgtttattgtgtcacacgggtgacaagctgtacagcgggtcactcga  
caagactgtgaaggtctggttgataggactggatgaggtgcagctactgaagacgcatgaacaaaggagcctgtgcaatgtctggttga  
aacggcacaatgtgtacttgggtgtccacaagcagtggtgtgcgtgtcctccaaagtgaagcaggcatgaagactcttgcacaacaa  
gcatgtgcaagcatgactatggaagatgggagattactgtgtggatgcacagataacagcattcaggagctagatgtatcgaaggggaca  
gtggccattctcagcaaggtgtcagaacctgcttggaaaaaagccatttatgcccttcaagtctatgatgacaagctctattcttggatc  
atgtgtggagggtgtttgtccaaggtgtggaggcttaaggacaaatcttggaggggcaattactaccaacctggatgttcagctatggt  
cgttgatgatgagttgtgtaccttggatcgaacgcgggtgtcatagaagtttgggttaaggaggagatttagtcaagttgcagggatgaacatt  
ggatgtaaggttatggcaattttggcatgagaatgtcctctattgtggatgtgaagatggaaaaataaggagatggacagctggatag  
>MtLIN2

mnttrtqilryttafitgvihqsqlrrhlietlhretpitnqvtkqlnlasealesavnsnssairssslsiaeiklllppeyplssflsliqtlrnha  
eesaiillrfrhsnpslarseiapslyehlfchlipvfrwfdeqrtrilpsasetpsrdgtdgysvndlfmppyakllssvssdqalklikele  
keyeevldencrvlavfyfkevlvknkdedstisppllilknaagsgsndrgglhrkeemkmpqlengrynpmwserdtsveflssssss

isslallypqrvsprvlhplksskywttpaylnsapetqfslidenllcsssdseaeneekdknvalleprqsqsqnkeqitfkesrgspd  
ypmadyentpphgsqkqtpkdfvc pitsnifddpvtletgqtyerkaieewfnrenitcpitrqklqntklpktnyvlkrivaswkeh  
npssvpptcecpykdsesvvkteipstspnsvitqatvdgmigelrcainnlymseilqesemaalqieklwrggnlgvdihsmlskp  
piingfeilfnsvepqvlqaavflaemgsrdnsviqtltrvdtdeceimalkkgleavvlylvpstvtltemavvesliavfnkke  
edlvnmclnpktaavlllqgiigssdeiassivktlfsekalgaivgslgaewaerivaveillrcmqedgtcrntiadkaelssimesfi  
handaerfkiveffseliklnrrtferilhiikeegpfstmhtllhlqtalqdqcpvmaglllqldllveprnmsiyreeaidsliscrnsdf  
pttqlaaadtimsqgrfsfgkplirevllkragidkgprsdvqvvdhmsnffseieitaeeeraaddwerkiasvlvshefgilfealadg  
mksripelrsacfisatwliymltltpdtgiqgaarvcllkpfvnlksakdiehrilsmalnsflhfsdglrdltasyakdilkglrelkrfs  
plasemlklvdenepktdiwrhkeiivdcrngdvlsvicfkdkisghtdgsikvwtlkdneilllqeiqehtkavtnltisepgdr  
ysgslrdtakiwsigkaahceqvhdmdqihnlvvtntstfcipqgagvkqvsmngesklinsnkyvklahagrlycgchdssv  
qeihtatgtisniqsgskrlgkaypihalqvhgeliyaagssldgtaikiwnnsnysmvgsldgtgsevramavsseliylgckggvvei  
wdkhhikvgtlqlgtnckvncmaldsneqilvigtsdgiqawemn\*

>LjLIN2

matvtvtrs qilcytasfisgvlspqelrrriatllnltipitnqltkhlnlaadsleraislstpalrsssls laeklllppeypvssflslirsln  
rpdesatllrifhssplarseiaplyerflslhlplvfwrdqlrsqilshddtdgysdsdyssavlp sakllskmsgdqaskvlelegey  
sevlencrilaeyfkevlvnr d g datsisppllilksaaedggrekenrkeqiptepppvlqngrynpmwserdasteflssssgrssh  
splypqrvsprpkipkpskhwtsppvlnspaetvflidenllcstsdseaeneekdknmallkprrsqsqeqmqtvfkesrgspdsp  
madydnppphngkqpppkdfvc pitsnifddpvtletgqterkaieewfnrgnitcpitrqklqntqlpktnyvlkrliaswkernp  
nsvpppcesscedsadaetvktttmpstspnsvitqatvdgminelryainnlymseileesekavliqieklwrgvnlgvdihsmlsk  
ppiingfeilfnsvepqvlqaavflaemgsrdnaviqtlttrvdtvegivalfkkgleavvlylvpstsvltemnmveslisvfsek  
eedlvkmclpkptaavlllahitgsseeiiasavktlfsekaigtivgslgaewgeeriaaveillrcmqedgtcrntiadkvelspilesfi  
sandgerfkivtffselvkl nrrt f e q i l h i k e e g l f s t m h i l h l q t a l q d q c p v m a g l l l q d l l d e p r k m s i y r e e a i d t l i s c r n t d f p  
atqlaaatims l q g m f s f g k p l i r e v l l k r a d t r k s s r s s v p d q m s t l f p e i t p e e k a a n d w e r k i a f v l v s h e l g i v f e a l a d g  
mksrnpqlrsacftsaa w l v y m l t i l p d t g i h g a a r v c l l k f l s k l n s a k d v e d r i l s m l a n s f l h f s d g l r d i s s y n n d i l k g l r e l k r s s  
plasemlklvkenestsdiwihkeliquecrenggvlsvicfkdkvfsg hadgsikvwlkdnlflhlqeiqehtkavtnlvisesgdr  
lysgslrdrtkiwsigktaihaqvhdmkdqihklvvtnsiacfisqgagvkqvplngesklinsnkyvklthangklycgchdssvq  
eihlatgtvssiqsgskllgkaypihalqihgeliyaagssldgsavkiwnnsnyslvgsldgtgsevramavsseliylgckggaveiw  
dkkhhsvrdtlqvgtnckvncmaldsieilvigtsdgiqawgm\*

>CsLIN2

mvdgtfttasnilhhistfiseilvqsdlrkrllstvydnfslsdeialkplglaaealenaaisadnssiktsslrcaeellslpenpissflslly  
glkhqnl nsalsldllf lypslarseiapilfeelghflpifh w f n e q r s k i l k s l a s n g g e y s r s e a e g w e v p c t k s k l s i d q t l k l  
kelesnyervldrncidfaehfkilerkeesewiaspkvkl l n k k e k w e m e q i l e d k l r t e h l s l p n g r y n p v w v e e d p i v s l v e v  
dsatkskspspspsspslssripplnfng eqessgsktfsifnsaaqaqddsskiedsgnaspesgeryntpskdfvc pitcnify  
dpvtletgqtyersaiqewlergnstcpitgqklentqlpktnyvlkrliaswleenpnfaldkpideadplvltspvsvisqasidrgm  
kevraivnlyasevleaeaaavlcverfwleenvemdiqlmllkppvinglveilvnsvneqvl saafllselgfkdaaviqtlrsvs  
dvdcivtlfkggfmeavvliyqlglssqslqemdmvgsl naikknerdvnkmrlshksaavillrkilgkskegsliavvvaenaiec  
iigslkakqveerisavgilrciqedgrcrniadtadlalvlesfievsneheqfeitflselvkl nrrt f e q i l q n i k d g g e y s t m h s l l y l  
qtarrdqspvvaglllqldvlveprkmsiyreeamdiliscldsdspstqisaetims l q g r f s t s g r p l t r y f l l e r a g f t k g h r k s i q r d t  
irsapevelt treeeraadewerkmafvlishdfllfeplakglnskfaalfsacfv satw l s h m l r s l p d t g i l e t a r v c l l d h f l s i f t t t d  
veektlgllainsfvhepdglqclssnmkdimrglrelkrstplafemlklvleeqdl tsefwchqelfqvdcstngevlsia y f k d k i i s  
ghsdgrikvwavrgtnlhlhevqehskgvtslvvlefeeklysgsldktikvwsldgtiqciqlhdvkdqihnlvsvktvacfipha  
girvyswggeskl nsskhvkclnlvggklfcgchdssi qevdlatgtlsyihsgsrkl l g k a n p i q a l q v y d e q l f s a s t a l d g a a v k i w  
stsnygmigslttsldvrsmavssdltylggkggmveiwsrekhnkidtlqmgrnckivcmaldereevlvigtsdgriqgwgl\*

>PtLIN2

maqprpssqilhhtafsetlsqphdhrhllstlrreapssnkttikplnlavenlenaisttnpsirssslraqlkvllsy p d s l l s s l l s l i  
ytlnnrptnasisl n i f h l d p s l a r s q i a p v l f e e l f v h l p v l r w f n e q r s r l s s l t d w g y d s d e n i g d v i v p c t k l l s k m s g d q a l  
elkelesiyeevidenckvfakyfkevvtngdenmitpps vilkelrkvdksevsdeiskmeelglmngrynpmwtegersvdf l s f  
igaskskysspsyprrvspetiknisrrstafptslnsdsepelsledn massgasscccsesaeieennrkmalfeptqsetqkqkqat  
vadfsstsseshmadtdsspggkhtppkdfvc pitsnifddpvtletgqtyerraiqewlergnstcpitrqkl nctqlpktnyvlkr lia  
swkeqnpagmvsippetqqkktspmskeipsstspns viiqttdgtiselnlaitnlcmseilnesemavliqierfwleamefdiq  
smlskppvingfevllnsadplvkatifllselgsrdkgvihtlrvdsdvdcivalfkkgleavvlyllrpptmsllemdmvesl l t a i  
knkeddmklmclpkptasvlllgilgsseds iissianaiistkviesiidsl qaeqteriaavgillkcmledgkcrntvadkaelapvld

sfmtasdgferfeivqflyelvklnrrtfneqilhiikdegefcsmhiflsylqvtlpdqspvvaglllqldllveprkmsiyreeaieslisslr  
nsefpaaqiaaaetivslqgrftvsgksltraflkqaghgkiyknlmrmeqlgklsgeieenleeeakaeeewerkmafalvsyefgllfe  
alaegmrsrcaelrsacfvswlvhmlgilpdtgiraaarvcflklleiftsskdiehkvlslvalnsfikdpegldltssmkdikdldre  
lrkssslaveilkvlsaghdssiaelwthnelvqvdcsgngevlsitfyndkifsghsdgtikvwtgkgsilhliqeihtkavtslavlqp  
geklysgsldrtarvwsignesltcvqvhdmkdqvhnlvvangiccipqgagvkvhswnggskllnpnkylkclslvhgklycgc  
qdssiqeidlttlatiqhgsrklkgktnpihalqvqngliysasspfdgaavkiwnasnyglvgspsilevrsmassdliyvvgckagt  
veiwdrkkqqnrveilqtgtndkvlcmalnanedvligtstgqiawgls\*

>CpLIN2

mtetssadilnrrttfisnlvskpdlerrllstlrrtirtsdnpgqsttalkpvklaakalqnaisaansfsiqllssldiaerllssaetplssflslh  
flhrptdasltlrrifyldpslartdispcelfeelfihllpvlqwneerdrilssgspisgyeidehfdlpsvivpcdkllskmsedqasrlke  
lersyeeaidencrvlalyfkevenkynggdssiipspvllkidmsknleyseendekikteeielengrynpiwvdgersvelysst  
csssgsssskskspfyprvsfttfnhdtsrhtsptssnlnsdseagsssgnfssskstpkieekktkmalstesskrkksrnksqpfsv  
pswlrldqlmadshnpssggkhtppkdfvcpitshlfdpvtletgqyerraiqewldrgnstcpitrqelbstqlpktnyvlkrliasw  
qeqnpglvsvyhsngnepitanpkmpatpvsvisqvaaadgtmtdlrqaimilclseflkdsekavqlierfwqevdmefeiqsmisk  
pavingfveilfnsvelrvlkaavfllselasrdntviqtlqvdsdvecivalfmgkglieavvliyllrpfvtliemdlvdsldvikkged  
ddllkmclpkptasvlllrqilaisndsleciigsletdwkeeriaavgillrcmkedgkcrhiiadkselapvlesfmgandaerfeivyfl  
selvklrrtfneqilhiirdecvstfmhtllvylqkahrdaqcpvtaglllqldllseprkmsiyreeaidtislclksnvpaaqiaaaeiiva  
lqgrftssgepltravllkrgrlktynalmrleqvgyngsedtlkeekaaddwerkmafvlvshefllfealaeglkснаelfsasf  
vaatwliqildvlpdtgirgaarvcflkhfvsifrsakdiedktlslalnsfmrdpegldrlashikeikglrelrkssslafdmklvlsegh  
dssaelwshkelvqvdcseengevlsivffkdikfsghsdgtikvwtgrgsilhliqevhehakavtslavlqsgeklysgsldktrvws  
gddgmrcvqvhdmdkdqvhnlvvansiscftpqgagvrhswnggskllnqskhvkcmalvlgklycgchdsvqeidlatgtfsti  
qsgsrklkgkpnvhsllqvynglvyaassldgatvkiwnasnsylvgsvsstlevramaisseiliylgckageveiwdrnkhnrletq  
tgtmgkvismaldsnelvigtsgrikawels\*

>VvLIN2

masatssaeilrhtaftsetlsqsklrllsalrrklptsdqnvrlqlnlaetlenaistsssfrrssslrvaekllshpdtlfssflsllyallnr  
hteaaahslinifssdpsearseiapvvfeefflihlplvlsfkdqsrslslssknlgydsdkrsrfeesvvvsgrllskmssggqtselkxle  
rdyeevldencrllvgfyfrevlgnengsrirppslifekxrksdefkfndeqnkveeiglngrynnptwtegersvefyssgssssksk  
sppfyprvskilrnqkssrtlsaisxlnsgselesssednlnssssesegetqkknrkmalfeprssiqkqkqpiyaessssspervm  
aadsddppgggkctppkdficpitshifddpvtletgqyerkaiqewidrgnstcpitrqklbstqlpktnyvlkrliaswqeqnpgfisi  
hsdnppdpdpifnstlpvlpstspnsviisqatmdgticelrlaitklcmseilresekavlrierfwqemnmgleiqtmkskpavingf  
veilfnsvdprvratvflcelgsrdktviqtltrvdsdvecivalfknllleavvlihlrpstisliemdmvesllvikkqdgflemcl  
kpktsaillgqilgssegnivtsiaktvvsakaiksivesleawaeriaavgillrcmqedgkcrhtiadkaelapvlesfmgasdger  
feiinnfsevlvklrrtfneqvlhiikdegafstfmhtlliyqltalqdqcpvvaglllqldllveprkmsiyreeamdtlislclnsdfpaaqia  
aaetivslqgrfsssgksltrasllkragldksyrtlmqvdlqsnssgeseenleeeqaadewerkmafvlvshefllfealaeglrnrq  
elfsscfmsatwlihlmltvlpdtgirgaarvcflkhfismfksakgteekalsmlalssfihdpegldltshmkdilkglrqlkksclav  
dmlkvfsegnssidlnhkelvqvdcseangevlsivcfrdkifsghsdgtikvwtgrgsilhlihetrehtkavtslailesgerlysgsl  
drtariwsigseaiycvqxhdmkdqvnnlvvansiacfipqgagvkvhswnggskllnpknkvcltlvhgklycgchdsvqeidl  
atgtlssiqsgtrklkgknpvhalqvhdgmissssfldgaavkiwsatnysmvgslastmevrtlavsseliylgsksgtveiwcrkkl  
irvetlqtgtngkvqcmavdgdeevlvvgtsdgrikawels\*

>SILIN2

mtesilrhtsvflseilahsevrhqnaastsnyssslklaenilvsleysentfssflslsvytllhkpvdlaalsllhvfytdpfiarveiaplvfe  
qlflihfipilhwynhrstimplseptkslstmsreqasqklkleneyeeildencvfatyfnvllaksqdkfidpptvipiwtldsve  
rdksvmklrrsskefskflsfypqrsvskalsqrssikskpsnfdlehesccssddsnlcsneskaenedmnkrmsllntrhtqylnek  
qpifgesschpdtlmsessgkntppkdfvcpitthvleevptlesgqyerkaiqewlrgnvtcpitrqklhrtqlpktnyvlkrliaswq  
ekdqnsaplhrcpenqpvkpaprtslrglgsldgtisklcraitnltseilresemaavlqieqfwregqmvdqtmkskppvvngfv  
eilsnsvdpdvlmaailfllselgsrdnsviqtltrvtdvecivalfkgkglleavvliyllmpfienlaemellhslklvlisreedlvsmfm  
kpkasvlllgalkniederaskivkrtsakvieailcsleaelfeerlsavillrcmqdgrcrniiadkaelthllesfiesndadrfeir  
flsemvklrrrafnekvlhiiknegtyssmhsllylqtalpdqcpvvaglllqldllaepkmsiyreeavdvlmclksndypdsqiaa  
adtllvlqgrfscsgnplireilvkagldrtdsnaaqndtylsssqeaveeelaadwerkmafslvsyefgllfealadglksksehlfs  
acflsatwlvymtilpdtgirgaarvslkqfvsifkssrdtenkalcllalsfisepegldltihvkdilkglrelkksstlavevfnlfsee  
ressadmcthekiealedcsingevssivcvrnkvfsshtdgtikvwtvaksilhliqeiirdhklavtslvvlqsgeklysgsldtrvws  
qdegieevehemkdhvnnllvsnslscfipqgagikvhswnगतkllnqqkyakcltlvkgklycgcvdsvnsiqdidlptgtinsiqsg



srkllgksspiyaiqvhdgqlfsaatsldgavvkiwntssysmvgsldqstidvrtmavsseliylggkggiveawckkkhnrvtlqtgi  
ngkvvsmaldtneetlvigtsdgriqvwrsls\*

>AcvLINh

mtpagslesddavlneliavvgyktldalldteqrrqhkelcaerlaaqdnvevqyaeqavlndwgmdaleeaimtsneetkkarle  
haekmlqvsallntrhttagvpnsylsawahlnlafvsklrdddckaaahilemflvepfyarvdfapslweklflshltsilgwyseqrh  
qiiasilpdgtdyswskdelsynvaeyknflsilgpeqalklqqleqvvyqdsldentrlyaryykewvnlprvspkrnmplmpiaep  
pmtptrelshlprafkfgppptsagfshshsgfstvyntsdnqvtlqgrpdaycgmtgthnmpmwdvdeesqiseggarvitygmel  
pqvvrhspftdqspgehlslqsseesslsargqsdgrgighqspiesqisekdsrktssrihaeshhkrssnalstlfqdqdtvvsssrss  
piiqrswspdsrktvenlslttialgshamakqkkktvkleaggesdgnervfqkeaiqdegqqktrtkrrskrsraqspdpdftng  
hghtlsqtlpdistatrpdkdfvc pitsqifndpvtletgqtyerkaiqewldrgnttcpitrqtlqslslpknnyvlkrviaswkeqhpdl  
aleygssenspcvprrtqqnyllltggpydqsvleasgspngsfpssttsksrqsqrtnghgsarnsstrteisqsaqetlidelkpavvci  
cssdelqeceavfkia rvwreskgaqavqvhlvqaemlkslmevl sisnnaevleaaiylseliqrdesvarlvavedpsye fvigll  
krkipssavlllyqllep llsqsvgsdlpllm dvlhkcehesvrcknqyqmflgpkeaaslmidkmltxaehssksalahgiismdglsp  
lvdsleaasmkerisavsilccmqadgksrsyiahsaqltpvlellhcdnergrhvtlftelvlrsinnqlqvikedgslstmhvlvr  
lqkapseqrpfia gflqlldllkpkkg smyreeaiealcnkdmlssqvaaaetlvclgsrfsssgsrllelslksagleqglkavlke  
eqslqkpavpdgilqenrveeekacmewerrvagalvnfenglifeglykgmksqpvalskpcniastwlvhmlpllpdtgvqdka  
ckilmpeyirilklskvteekalavlahsfvddsglqelvqrandisgplrqlrsskmastilkk lissplvnvpelwahee iappidag  
vngevrclaqiagr lfsghsdgsmkvwdcrkknlilqlk ehqksvtclfvah tgdklysgsldktvkvwligldevqlkthetkepv  
qclvangtmlylgapqssgvrvlqseagmktllpnkhvqsm tmedgrllcgctdnsiqeldvskgtvailqqgvrtl lgkkaiyalqvy  
ddklyssgscvegvcakvwrldkdslegqftnldvramvvddefvylgsnagvievwlrrrlvkvagmnigckvmailahenvly  
cgcedgkirrwtag\*