

**Új *Medicago truncatula* szimbiotikus gének azonosítása
és jellemzése és az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának
funkcionális analízise**

című doktori értekezés tézisei

készítette: Kovács Szilárd

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Kaló Péter, tudományos főmunkatárs
Dr. Endre Gabriella, tudományos főmunkatárs

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növénybiológiai
Intézet



**Szeged,
2022**

Bevezetés

A pillangósvirágú növények képesek nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat kialakítására talajlakó (rhizóbium) baktériumokkal. A biológiai nitrogénkötés leghatékonyabb formája az endoszimbiózis, amelynek során a növény gyökerén egy új szerv, az úgynevezett szimbiotikus gyökérgümő fejlődik. A baktériumok terminális differenciációt követően a gyökérgümőben végzik a légköri nitrogén redukálását, melyhez a szükséges energiát a növény biztosítja.

A gümő kialakulásának lépései a következők: a rhizóbium baktériumok megtapadása a gyökérszőr felszínén, melyet a baktériumok csapdázása (gyökérszörgöbülés) követ; ezután kialakul az infekciós fonál, melyen belül a gyökér kéregsejtjei között haladva a baktériumok eléri a már kialakult gümőkezdeményt (primordiumot); a gümősejtekbe a baktériumok növényi membránnal határolva lefűződnek; végül a baktériumok differenciálódnak és kialakul a szimbioszóma, amely a nitrogénkötés helye.

A szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolata kialakulása során a két partner között egy többlépcsős kommunikáció zajlik, ennek első lépése szignálmolekulák segítségével történik.

A növény által termelt flavonoidokat érzékelik a baktériumok és NOD-faktorokat (nodulációs faktorok) kezdenek el termelni, melyek a növényben génexpressziós és fejlődésbiológiai változásokat idéznek elő.

Az utóbbi évtizedben számos olyan növényi gént azonosítottak, melyek szükségesek a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához. Ezen gének funkcionális analizisével sikerült feltérképezni a rhizóbium által elindított NOD-faktor szignálút vonalat, valamint a fertőzési és gümőképződési folyamatok főbb eseményeit. A két partner közötti kölcsönhatás megértéséhez azonban fontos az összes olyan szimbiotikus gén azonosítása és jellemzése, amelyek nélkülözhetetlenek a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához.

Csoportunk kutatási témája a pillangósvirágú modellnövény *M. truncatula* és *Sinorhizobium* sp. között kialakuló nitrogénkötő szimbiózis genetikai és molekuláris biológiai vizsgálata. Ennek során olyan növényi géneket azonosítunk, amelyek nélkülözhetetlenek a nitrogénkötő szimbiózis folyamatához. Munkánk során a klasszikus genetikai módszereket jelentő fenotípus vizsgálatokat és a legmodernebb molekuláris biológiai technikákat használjuk.

Célkitűzések

Célul tűztük ki az európai *Medicago truncatula* *Tnt1* inszerciós mutáns gyűjteményből új szimbiotikus nitrogénkötésben mutáns vonalak izolálását, a mutációt szenvedett szimbiotikus gének azonosítását és funkcionális analízisét. A tervezett munkánk az alábbi fő pontokba szedhető:

1. A feltételezett szimbiotikus mutáns vonalak fenotípus adatainak megerősítése, új *M. truncatula* inszerciós vonalak azonosítása.
2. Az azonosított mutáns vonalakban az inszerciós események meghatározása új-generációs szekvenciális módszer segítségével. Az inszerciókat tartalmazó gének *in silico* és elérhető expressziós adatbázisok adatainak tanulmányozásával olyan jelölt gének azonosítása, amelyek mutációja feltételezhetően az adott vonalban a szimbiotikus fenotípust okozhatták.
3. A vonalak mutáns egyedeinek vad típusú növényekkel történő visszakeresztezése F1 hibrid és F2 szegregáló populáció előállítására céljából.

4. A szegregáló populáció és a szekvenálási adatok elemzése után a ko-szegregációt mutató gén azonosítása a vonalakban. A génnek azonosságának bizonyításához komplementációs kísérletek elvégzése.
5. Az általunk azonosított szimbiotikus gén(ek) funkcionális vizsgálata, a szimbiózisban betöltött szerepének tisztázása.

Ezek mellett célul tűztük ki a már ismert *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízisét. A projekt tervezett főbb lépései a következők voltak:

1. A már korábban azonosított *nsp2-2* mutáns növényvel allélikus NF-FN9199 mutáns (amely az *NSP2* gén kodoló régiójában hordoz egy pontmutációt) vonal genetikai komplementációja, és ezzel egy új *nsp2* allél azonosítása.
2. A már ismert *nsp2-3* és az új allél részletes fenotípus vizsgálata.
3. A két pontmutáns allél által kódolt fehérje funkcionális vizsgálata. Az NSP1 fehérjével történő kölcsönhatás tesztelése.

Módszerek

1. *Medicago truncatula* vad és különböző szimbiotikus mutáns növények növesztése.
2. *M. truncatula* növények vizsgálata szimbiotikus tesztekben a *Sinorhizobium medicae* (WSM419) és *Sinorhizobium meliloti* (Sm1021) baktériummal történő fertőzést követően.
3. *M. truncatula* növények kezelése a WSM419 baktériumtörzsből tisztított NOD-faktorokat tartalmazó exudátummal.
4. A β -glükuronidáz (GUS) és β -galaktozidáz (LacZ) enzimaktivitásokon alapuló hisztokémiai festések.
5. A növényi védekezési reakció kimutatására alkalmas kálium-permanganát kezelést követő metilénkék festés.
6. A bakteriális és növényi DNS kimutatására alkalmas SYTO13 festés.
7. Fény- és konfokális fluoreszcens mikroszkópia.
8. *M. truncatula* növényből genomi DNS tisztítás QuicGene DNS izoláló kittel.
9. Polimeráz láncreakció (PCR) DreamTaq -, és Phusion DNS polimeráz alkalmazásával.

10. Gateway alapú rekombináns DNS technikák alkalmazása különböző vektor konstrukciók előállítására és Sanger féle szekvenálási technika a klónok ellenőrzésére.
11. *Agrobacterium rhizogenes*-közvetített gyökértranszformáció.
12. Promóteraktivitás vizsgálatok, komplementációs kísérletek *M. truncatula* növényben
13. Tranziens génexpressziós vizsgálatok *Nicotiana benthamiana* levelekben.
14. Élesztő kettős-hibrid technika és Bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs módszer alkalmazása fehérje – fehérje interakciók kimutatására.
15. β -Galaktozidáz enzimaktivitás mérés és anti-HA western-blot analízis élesztő sejtekből származó mintákon.

Eredmények

1. A *M. truncatula Tnt1* inszerciós mutáns gyűjtemény vizsgálatával azonosítottunk hét szimbiotikus mutáns vonalat, melyek nem képesek nitrogénkötő szimbiózis kialakítására.

Klasszikus genetikai – és új-generációs szekvenálási módszerek kombinálásával két vonalban sikerült azonosítanunk a szimbiotikus fenotípussal együtt szegregáló inszerciókat. Emellett mindkét esetben a mutációt szenvedett gén visszajuttatásával sikerült menekítenünk a mutáns fenotípust, ezzel bizonyítva a génnek szimbiotikus funkcióját. Az egyik vonalban azonosított génnek az *IEF* (*Infection-related Epidermal Factor*) nevet adtuk, míg a másik vonal a *NADI* (*Nodules with Activated Defense I*) gén egyik új allélja.

2. Kimutattuk, hogy az *IEF* gén elengedhetetlen az infekciós fonál fejlődéséhez és a gümőprimordium inváziójához. Az *IEF* gén a szimbiotikus interakció korai szakaszában, az infekciós fonál fejlődése során kizárólag a bőrszövetben indukálódik a rhizóbium partnerrel történő fertőzést követően, illetve a rhizóbium partnerből tisztított NOD-faktorokat tartalmazó exudátummal történő kezelést követően.

3. Az *IEF* gén a NOD-faktor szignálútvonalon belül az ERN1 transzkripció faktor szabályozása alatt áll direkt, vagy indirekt módon.
4. Bizonyítottuk, hogy az *IEF* génnek nincs funkciója a gümőfejlődés szabályozásában.
5. Élesztő két-hibrid és Bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs módszerek segítségével kimutattuk, hogy az *IEF* fehérje képes interakcióba lépni egy másik, az infekciós fonál fejlődéséhez szintén elengedhetetlen szimbiotikus fehérjével, az RPG-vel.
6. Kimutattuk, hogy a *nad1-4* mutánsban rhizóbium baktérium lefűződését követően erős védekezési reakciók indulnak be a szimbiotikus partnerrel szemben. A védekezési reakciók következtében a rhizóbium baktériumok differenciációja nem megy végbe és a *NAD1* gén hibája miatt a baktériumok elpusztulnak. A promóteraktivitás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a *NAD1* gén a rhizóbium baktériumokat tartalmazó növényi sejtekben mutat aktivitást.
7. Bizonyítottuk, hogy az NF-FN9199 mutáns vonal az *NSP2* gén egy új pontmutáns allélja (*nsp2-6*). Részletesen jellemeztük továbbá a már ismert *nsp2-3* és az általunk azonosított *nsp2-6* mutánsok szimbiotikus fenotípusát. Az

nsp2-6 egy teljes funkcióvesztéses allélnak bizonyult, míg *nsp2-3* esetében egy rhizóbium törzsfüggő gyenge fenotípust állapítottunk meg.

8. Az *nsp2-3* fenotípusos vizsgálatával bizonyítottuk, hogy az *NSP2* génnek szerepe van a gümősejtek bakteriális inváziójának szabályozásában is.

9. Élesztő kettős-hibrid és Bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs módszerek segítségével bizonyítottuk, hogy az *NSP2* fehérje 244. pozíciójában lévő hisztidin aminosavnak kulcsfontosságú szerepe van az *NSP2* funkciójának biztosításában.

Summary

In this dissertation I targeted the identification and characterization of novel *Medicago truncatula* mutant lines and genes required for the nitrogen-fixing symbiotic interaction. The other objective was the comparative analysis of the two point mutant alleles of the already known *Nodulation Signaling Pathways 2 (NSP2)* gene.

Our genetic screen of the European *Tnt1* insertional mutant collection identified seven new symbiotic mutant *M. truncatula* lines. Using the combination of classical genetic and next-generation sequencing methods we could identify the impaired symbiotic genes in two mutant lines. The identity of the two genes were confirmed by genetic complementation experiments

One of the mutant lines was characterized as an infection mutant wherein rhizobia failed to invade the developing nodule. Detailed phenotypic analyses revealed that the formation of the tube-like structure called infection thread is impaired in this mutant. Based on the results described in the thesis, we termed this gene *Infection-related Epidermal Factor (IEF)*. Monitoring the promoter activity of the *IEF* gene during the symbiotic interaction, we demonstrated its epidermis-specific activity within a very short period

following inoculation with rhizobia or NOD-factor (NF) treatment. We could place the position of *IEF* in the hierarchy of the already known components of the NF signal transduction pathway by analysing the activity of the *IEF* promoter in known symbiotic mutants. We demonstrated that the nodule organogenesis was intact in the *ief-1* mutant and *IEF* is not required for induction of nodule formation. Furthermore, we found that the encoded protein interacts with the formerly identified RPG protein required for infection thread formation. This result indicates that IEF and RPG function at the same level during the infection process. Another mutant line identified in the screen was deficient in the gene *NAD1*. Mutant nodules of *nad1* showed extensive plant defense responses following bacterial release from infection threads. Based on the detailed phenotypic analysis of the *nad1* symbiotic mutants, we concluded that the *NAD1* gene is required for the control of the defense response during the invasion of the symbiotic nodule by rhizobia. The other aspect of my dissertation was the comparative analysis of the two point mutant alleles of the already known *Nodulation Signaling Pathways 2 (NSP2)* gene. The mutation in one of the novel point mutant alleles, in the *nsp2-6*, severely affected the function of the *NSP2* gene. To

analyse this mutant allele in more details, we compared the *nsp2-6* allele line with the formerly identified *nsp2-3* mutant. Both mutants carry a single amino acid substitution in the VHIID motif of the NSP2 protein. We found that the two mutant alleles show distinct root hair response to bacterial infection. Although the *nsp2-3* mutant developed aberrant infection threads, rhizobia were able to colonize nodule cells in this mutant. The encoded NSP2 proteins of the *nsp2-3* and the novel *nsp2-6* mutants interact with NSP1 diversely and, as a consequence, the activation of early nodulin genes and induction of nodule organogenesis are distinct in the two *nsp2* alleles. The novel mutant with amino acid substitution D244H in NSP2 shows similar defects in symbiotic responses as a formerly identified *nsp2-2* mutant carrying a large deletion in the *NSP2* gene. In addition, we found that rhizobial strains induced delayed nodule formation on the roots of the *ns2-3* weak allele. Our study highlights the importance of a conserved Asp residue in the VHIID motif of NSP2 that is required for the formation of a functional NSP1-NSP2 signaling module. Furthermore, our results imply the involvement of NSP2 during differentiation of symbiotic nodule cells.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10053170

Összesített impact factor: 20.9

A fokozatszerzési eljárás alapját képező közlemények jegyzéke:

Kovacs, S., Fodor, L., Domonkos, A., Ayaydin, F., Laczi, K., Rakhely, G., and Kalo, P. (2021). Amino Acid Polymorphisms in the VHIID Conserved Motif of Nodulation Signaling Pathways 2 Distinctly Modulate Symbiotic Signaling and Nodule Morphogenesis in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* 12, 709857. doi: 10.3389/fpls.2021.709857

IF: 5.753

Kovacs, S., Kiss, E., Jenei, S., Feher-Juhasz, E., Kereszt, A., and Endre, G. (2022). The *Medicago truncatula* IEF gene is crucial for the progression of bacterial infection during symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact.* doi: 10.1094/MPMI-11-21-0279-R

IF: 4.171

Domonkos, A., **Kovacs, S.**, Gombar, A., Kiss, E., Horvath, B., Kovats, G.Z., Farkas, A., Toth, M.T., Ayaydin, F., Boka, K., Fodor, L., Ratet, P., Kereszt, A., Endre, G., and Kalo, P.

(2017). NAD1 Controls Defense-Like Responses in Medicago truncatula Symbiotic Nitrogen Fixing Nodules Following Rhizobial Colonization in a BacA-Independent Manner. *Genes (Basel)* 8. doi: 10.3390/genes8120387

IF: 3.44

További közlemények:

Ting, W., Benedikta, B., **Kovacs, S.**, Kereszt, A. (2022). Varietas delectat: exploring natural variations in nitrogen-fixing symbiosis research. *Front Plant Sci*, 856187. doi: 10.3389/fpls.2022.856187

IF: 5.753

Toth, V.R., Endre, G., **Kovacs, S.**, Presing, M., and Horvath, H. (2017). Morphological and Genetic Variability of Myriophyllum spicatum in Different Shallow Water Bodies of Hungary. *Wetlands* 37, 351-362. doi: 10.1007/s13157-016-0875-z

IF: 1.81

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Kaló Péter és Dr. Endre Gabriella, mint a közlemények felelős szerzői igazoljuk, hogy Kovács Szilárd PhD jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló három tudományos publikáció létrehozásához. Az értekezésében bemutatott eredményeket más PhD értekezésben nem használjuk fel. Kijelentem, hogy a jelölt által végzett kísérletek eredményét saját magunk és további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2022. 03. 30.

Dr. Kaló Péter

témavezető

Dr. Endre Gabriella

témavezető