

Szimbiotikus peptidek szerepe a nitrogénkötő gümők fejlődésében

című doktori értekezés tézisei

szerző:

Pál Alexandra

Témavezetők:

Dr. Endre Gabriella, tudományos főmunkatárs

Dr. Lima Rui Dániel, tudományos munkatárs

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Növénybiológiai Intézet



**HUN
REN**



2025

Szeged

BEVEZETÉS

A pillangósvirágú növények és a rhizobium baktériumok közötti szimbiotikus kapcsolat a gyökérgümők kialakulásához vezet, ahol a baktériumok – bakteroidokká differenciálódva – képesek a légköri nitrogént ammóniává redukálni. *Medicago truncatula* esetében indeterminált típusú gyökérgümők alakulnak ki, amelyekben a bakteroidok terminális differenciáción mennek keresztül: megnyúlnak, poliploidizálódnak és elvesztik osztódóképességüket, így kizárólag a gümősejtekben maradnak életképesek.

A folyamat szabályozásában meghatározó szerepet töltenek be a gazdanövény által szekretált gümőspecifikus peptidek. A legjelentősebbek közé tartoznak a ciszteinben gazdag nodule-specific cysteine rich (NCR) peptidek, amelyek változatos szerkezeti és funkcionális tulajdonságuk révén képesek irányítani a baktériumok differenciációját. Az NCR peptidek mellett a gümőspecifikus glicinben gazdag fehérjék (nodulin glycine-rich proteins, nodGRP-k) is fontos szabályozó faktorok. A gümők élettartamát és funkcionális állapotát az öregedési (szeneszcencia) folyamatai alapvetően

meghatározzák. A korai szeneszencia különösen káros, mivel a nitrogénfixáció idő előtt leáll, a bakteroidok lebomlanak, és a gümő struktúrája fokozatosan degradálódik. Munkánkban kiemelt figyelmet fordítottunk a *nodGRP3C* gén szerepének feltárására, amely a *M. truncatula* gümőfejlődésében és a szimbiózis stabilitásában egyaránt kulcsszereplőnek bizonyult.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásom célja a szimbiotikus nitrogénkötés zavarára adott növényi válaszreakciók, különösen a korai gümőszenezencia sejtes és molekuláris jellemzőinek feltárása volt különböző Fix^- *M. truncatula* mutánsokban és transzgenikus *nodGRP3C* vonalakban. Arra kerestem választ, hogy e folyamat mennyiben tekinthető egységes, génhibáktól független válasznak a szimbiózis hatékonyságának elvesztésére, illetve, hogy a *nodGRP3C* gén expressziójának változása milyen hatással van a gümőfejlődésre és működésre.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Molekuláris biológiai módszerek

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR), RNS-interferencia és túltermelő konstrukciók előállítása a *nodGRP3C* gén vizsgálatára. Transzkriptomikai vizsgálat RNA-seq alapján, bioinformatikai analízissel.

Növényi munka és sejtbiológiai módszerek

Stabil transzgenikus *M. truncatula* vonalak előállítása, bakteroid izolálás, sejtosztódás vizsgálata EdU inkorporációval, sejtploiditás elemzése áramlási citometriával.

Mikroszkópia

Sztereo mikroszkóp, konfokális mikroszkóp, pásztázó és transzmissziós elektronmikroszkóp használata.

Biokémiai módszerek

GUS-festés, western blot.

EREDMÉNYEK

Korai gümőszeneszencia különböző Fix^- *M. truncatula* mutánsokban

Kutatásaim során különböző Fix^- *M. truncatula* mutánsokban vizsgáltam. Az elemzett vonalak a következő génekben hordoznak funkcióvesztéssel járó mutációkat: *dnf4* (*NCR211*), *dnf7-2* (*NCR169*), TR183 (*NCR-new35*), valamint két további mutáns, a TR36 és TRV36, amelyek pontos genetikai hibája jelenleg nem ismert. A cél az volt, hogy azonosítsuk azokat a közös sejtes és molekuláris jegyeket, amelyek a szimbiotikus nitrogénkötés zavarát követően konzisztensen jelennek meg, és jellemzőek a korai gümőszeneszencia folyamatára. A gümő működésének vizsgálatára a bakteriális *nifH* promóterhez kapcsolt GUS riportert alkalmaztam, amely a bakteriális nitrogénáz enzim aktív expressziójára utal. Ennek aktivitása a különböző Fix^- mutánsokban eltérő időpontban csökkent. A *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban már 17 nappal a fertőzés után (dpi) csökkent GUS-jel mutatkozott, míg a TR36 és TRV36

vonalakban ez a csökkenés később, 21 dpi körül vált kifejezetté.

A bakteroid-izolálási kísérletek alapján kimutattam, hogy a terminálisan differenciált baktériumok a gümőkben idővel eltűntek, helyüket pedig szaprofitikus-jellegű baktériumok vették át. Ennek időbeli lefutása a különböző mutánsokban eltért, a súlyosabb mutációkat hordozó vonalakban (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183) a szaprofitikus sejtek korábban, már 10 dpi körül megjelentek, míg a TR36 és TRV36 esetében ez a jelenség később következett be (17 dpi).

Konfokális mikroszkópos vizsgálattal megfigyelhető volt az endodermisz záródása, melynek hatására a víz- és ionfelvétel korlátozódik és az oxigén-diffúzió is gátlódik. A *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 vonalak esetében az endodermisz már 7 dpi körül záródott, míg a TR36 és TRV36 mutánsoknál ez a jelenség 17 dpi-nél vált általánossá.

A szimbiotikus sejtek endoreduplikációját és érettségét a sejtmagok ploidiaszintjének meghatározásával, áramlási citometria segítségével elemeztem. Az eredmények azt mutatták, hogy a Fix⁻ gümőkben csökkent a 8C, illetve >8C tartalmú sejtmagok aránya, ami arra utal, hogy a

szimbiotikus sejtek nem érik el a megfelelő érési állapotot, és a differenciáció folyamata megakad.

A qPCR analízis három funkcionális géncsoportot célzott:

- a) Szeneszencia marker gének: *CP2*, *CP6*, *chitinase 2*, *PAP22*, melynek expressziója minden mutánsban szignifikánsan megemelkedett.
- b) Szimbiotikus gének: *NIN*, *RSD*, *symCRK*, *dnf2*, melyek működése szükséges a bakteroid-állapot kialakításához és fenntartásához. Ezeknek a géneknek az expressziója nem mutatott szignifikáns emelkedést, esetenként csökkent is.
- c) Immunitás gén: *PR10.1*, melynek az expressziója a 7. és 11. napon nem tért el a kontrolltól, míg 15 dpi-re a *dnf4*, *dnf7-2* és *TR183* mutánsokban csökkent, *TR36* és *TRV36* vonalakban pedig stabil maradt.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált mutáns gümők korai szeneszenciáját elsősorban a szeneszenciához kapcsolódó gének idő előtti túlzott expressziója, és az ebből következő fokozott proteolitikus aktivitás okozza, nem pedig a gazdanövény védekező mechanizmusainak aktiválódása.

A *nodGRP3C* gén expressziójának hatása a gümőfejlődésre

A *nodGRP3C* gén szerepét a gümőfejlődés szabályozásában antiszensz (AS), túltermelő (OE) és RNS-interferencia (RNAi) konstrukciókkal vizsgáltam. A *nodGRP3C* AS vonal gümői fehérek, kisméretűek, a gümőmetszeteken kevés fertőzött (szimbiotikus) sejt figyelhető meg. A baktériumok terminális differenciációja nem teljes, a sejtek megnyúlnak, de differenciációjuk részleges maradt.

A *nodGRP3C* túltermelő (OE) vonalakban a gümők rózsaszínűek, de kisebb méretűek voltak a kontrollhoz (R108) képest. TEM-metszetekben a szimbiotikus sejtekben nagymértékű keményítő-raktározás figyelhető meg, valamint degradált mitokondriális morfológia. SEM-vizsgálatok alapján az OE vonalakból izolált bakteroidok rövidebbek, kevésbé érettek, és durva felszíni morfológiát mutatnak. Ezek az eltérések arra utalnak, hogy a *nodGRP3C* túlzott expressziója a szimbiotikus sejtek anyagcseréjét és bakteroid-stabilitását is befolyásolja.

A *nodGRP3C* gén expressziójának globális hatását transzkriptomikai vizsgálattal elemeztem, amelyet az RNAi vonalból készítettünk 8 dpi időpontban. Az OE vonalakban számos védekezési gén, köztük a *PR10*, *PR5*, valamint különböző defenzinek (*MtDefNS2*, *MtDefMD1*) expressziója jelentősen nőtt. Emellett megemelkedett az *MtRbohJ* és több peroxidáz szintje is, jelezve az oxidatív stresszválasz aktiválódását. A hormonális válasz szabályozásában a CKX enzimek emelkedése, valamint több szacharóz transzporter (*MtSWEET7*, *MtSWEET16*, *MtSUT1.4*) expressziójának csökkenése is kimutatható volt.

Az RNAi vonalakban ezzel szemben számos védekezési gén expressziója csökkent (*MtDefNS1*, *MtDefNS5*, *PR10-5*), valamint egyes szimbiotikus regulátorok (pl. *asENOD11*) szintje is alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Az NCR-gének expressziója OE-ben túlnyomórészt nőtt, míg RNAi vonalakban csökkent. A *nodGRP* család tagjai közül OE-ben a *nodGRP5A* és *nodGRP5B* expressziója nőtt, míg RNAi-ben több, például a *nodGRP3B*, *nodGRP10*, *nodGRP1D*, *nodGRP21*, *nodGRP45* expressziója csökkent.

A *nodGRP3C* expressziójában bekövetkező bármilyen zavar – legyen az géncsendesítés vagy ektopikus túltermelés – súlyos szerkezeti és funkcionális rendellenességekhez vezet a gümőkben, ami negatívan befolyásolja a *M. truncatula* és szimbiotikus bakteroidok közötti kapcsolatot.

SUMMARY

A detailed analysis of *M. truncatula* Fix⁻ mutants revealed that premature nodule senescence represents a conserved developmental response to symbiotic failure. Five mutants (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TR36, TRV36) with distinct genetic lesions were investigated. All developed ineffective nodules that ceased growth within 1–2 weeks post inoculation, in contrast to wild type, which remained functional for up to four weeks.

Histochemical assays using a *nifH::GUS* reporter demonstrated sustained nitrogenase activity in wild type, whereas Fix⁻ nodules displayed an early loss of signal. Microscopy showed that differentiated bacteroids progressively disappeared and were replaced by saprophytic-like bacteria. Bacteroid isolation confirmed

that this transition occurred earlier in *dnf4*, *dnf7-2*, and TR183 than in TR36 and TRV36. Endodermal closure was detected at 7 dpi in *dnf4*, *dnf7-2*, and TR183, while TR36 and TRV36 showed closure at 17 dpi. Flow cytometry revealed a sharp decline in highly polyploid nuclei (>8C), particularly in fast-senescing lines, indicating premature termination of endoreduplication.

Leghemoglobin accumulation, normally essential for oxygen buffering, was severely impaired. Transcripts of *Lb2* and *Lb3* decreased significantly in *dnf4*, *dnf7-2*, and TR183 at 15 dpi, while TR36 and TRV36 exhibited delayed but detectable expression. These data suggest that leghemoglobin dynamics are tightly linked to nodule longevity.

Gene expression profiling by qPCR highlighted three major trends. Symbiotic regulators (*NIN*, *SymCRK*, *RSD*, *DNF2*) were reduced in mutants, consistent with impaired maintenance of symbiosis. Senescence-associated genes (*CP2*, *CP6*, *chitinase 2*, *PAP22*) were strongly induced between 7–11 dpi, correlating with cellular degradation. In contrast, immune-related markers such as *PR10.1* were not upregulated, indicating that early senescence reflects

intrinsic developmental regulation rather than a defense response.

These results indicate that early senescence in the analyzed mutant nodules is primarily driven by the premature overexpression of senescence-associated genes and the resulting increase in proteolytic activity, rather than by the activation of host defense mechanisms.

The role of *nodGRP3C*, a nodule-specific glycine-rich protein gene, was also examined. Antisense (AS) lines showed ~50% reduction in transcript levels, leading to small, white nodules with poor bacterial differentiation. Confocal microscopy revealed smaller, less viable bacteroids. In overexpression (OE) lines, initial development was unaffected, but later stages showed severe abnormalities, including cell degradation, disrupted bacteroids, and starch accumulation. RNA-seq analysis of RNAi lines supported these observations, revealing increased expression of stress- and defense-related genes such as *PR10* and defensins.

The *nodGRP3C* is essential for proper bacteroid differentiation and nodule maintenance. Both loss and overproduction of this protein disrupt the balance of the

symbiotic interaction, highlighting its central role in regulating nodule stability.

Tudományos közlemények

MTMT azonosító: 10036948

Összesített impakt faktor: 17,428

Alexandra Pál, Rui M. Lima, Hilda Tiricz, Ferhan Ayaydin, Attila Kereszt, Éva Kondorosi, Edit Ábrahám: Diverse triggers, common outcome: Senescence in Fix-*Medicago truncatula* nodules (Plant Physiology, 2025, accepted, doi to be assigned)

IF: 6,900

Bettina Szerencsés, Csaba Papp, **Alexandra Pál**, Sándor Jenei, Nelli Németh, Csaba Vágvölgyi, Ferhan Ayaydin, Gabriella Endre, Éva Kondorosi, Ilona Pfeiffer: Plant-derived nodule-specific cysteine-rich peptides as potent antifungal agents against *Cryptococcus neoformans*: mechanisms of action, chimeric peptide enhancement, and immunomodulatory effects (Current Research in Microbial Sciences, 2025, doi: 10.1016/j.crmicr.2025.100407)

IF: 5,800

Nikolett Bódi, Zsanett Jancsó, Petra Talapka, **Alexandra Pál**, Marietta Zita Poles, Mária Bagyánszki, Edit Hermes and Éva Fekete: Gut region-specific rearrangement of the cellular and subcellular compartments of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol consumption in rats (Histology and Histopathology, 2014, doi: 10.14670/HH-29.1547)

IF: 2,359

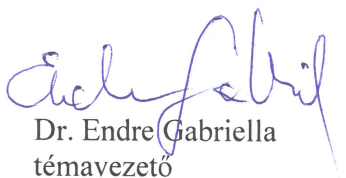
Petra Talapka, Lajos István Nagy, **Alexandra Pál**, Marietta Zita Poles, Anikó Berkó, Mária Bagyánszki, László Géza Puskás, Éva Fekete, Nikolett Bódi: Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease (World Journal of Gastroenterology, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16690)

IF: 2,369

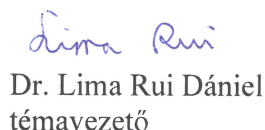
Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Endre Gabriella és Dr. Lima Rui Dániel témavezetők és a közlemény felelős szerzői, Prof. Dr. Kondorosi Éva és Dr. Ábrahám Edit igazolják, hogy Pál Alexandra PhD jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló tudományos publikáció létrehozásához. Az értekezésében bemutatott eredményeket más PhD értekezésben nem használjuk fel. Kijelentik, 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.

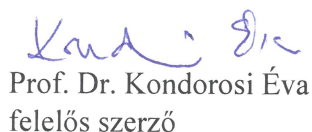
Szeged, 2025. 08. 22.



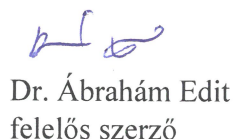
Dr. Endre Gabriella
témavezető



Dr. Lima Rui Dániel
témavezető



Prof. Dr. Kondorosi Éva
felelős szerző



Dr. Ábrahám Edit
felelős szerző