

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE  
*MEDICAGO TRUNCATULA* NCR  
PEPTIDEK FUNKCIONÁLIS  
VIZSGÁLATÁHOZ**

**SENLEI ZHANG**

**TÉMAVEZETŐ: DR. KERESZT ATTILA**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS  
INFORMATIKAI KAR**

**SZEGED**

**2020**

## **Irodalmi áttekintés**

A növények növekedése és fejlődése nagymértékben függ a környezetben található és a hozzáférhető elemek jelenlététől, úgymint a széntől (C), a hidrogéntől (H), oxigéntől (O), nitrogéntől (N), foszfortól (P) és kéntől (S). A szén és az oxigén mennyisége nem limitáló tényező a növény számára, de más elemek, elsősorban a nitrogén, igen. A nitrogén elengedhetetlen az aminosav-szintézishez, ami az alap építőeleme a fehérjéknek és peptideknek. Ellenben a rhizóbium számára fordított a helyzet, hisz a baktérium által kifejezett nitrogenáz segítségével képes a légköri nitrogén megkötésére, de a talajban található szén alacsony mennyisége gyakran a növekedést gátló tényező. Az elemek megszerzésének ezen egymást kiegészítő volta biztosítja az alapot a pillangósvirágú növények és a rhizóbium

baktériumok által kialakított szimbiózishoz, ami lehetővé teszi a szén és a nitrogén kölcsönös megosztását.

A pillangósvirágú növények képesek gyökérgümő létrehozására a rhizóbium szimbióta számára. A gümő nem csupán lehetővé teszi a nitrogén és szén cseréjét, de biztosítja a megfelelő sejten belüli környezet is a nitrogén megkötésére. A különböző növényfajokon található gümők jellemzőek az adott fajra és két fő típusba oszthatók: determinált és indeterminált gümők (Franssen és mtsai., 1992; Maunoury és mtsai., 2008). A szójababon és a *Lotus japonicus*-on található determinált gümők merisztémája egy idő után eltűnik, ezzel a gümő kerekded formáját adva, zónák kialakulása nélkül. A *Medicago* indeterminált gümő hosszúkas, hengeres alakú és különböző zónákra osztható fel az aktív merisztematikus régió jelenléte miatt (Sutton,

1983). A gümőben a nitrogénkötő baktérium sorsa is két típusba sorolható: reverzibilis és irreverzibilis/terminálisan differenciált bakteroid. Közel izogén rhizóbiumok használatával Mergaert és mtsai., 2006 bizonyították, hogy a bakteroid differenciációját a gazdanövény irányítja. Az IRLC hüvelyesek, mint a *Medicago*, esetében ezért a terminális bakteroid differenciációért az NCR peptidek és a GRP-k tehetők felelőssé.

A *Medicago truncatula* modellnövény több mint 700 NCR peptide fejez ki, amik a nitrogénkötő bakteroidok terminális differenciációját irányítják a gümőben. Ezek a peptidek kizárólag csak IRLC hüvelyesekben fejeződnek ki, még hozzá rendkívül specifikus expressziós mintázattal, azaz csak a gümő fertőzött, szimbiotikus sejtjeiben és egy tesztelt kísérleti körülmény sem tudta kiváltani a

termelődésüket. Figyelembe véve az *NCR*-ek nagy számát meglepő, hogy két *NCR* gén, az *NCR169* és az *NCR211* elengedhetetlen a szimbiotikus nitrogénkötéshez.

### **Célkitűzések**

- A nélkülözhetetlen *NCR* gének létének felismerése vezetett ahhoz, hogy felkutassuk, vannak-e további ilyen *NCR*-ek. Az *NCR* gének nagyszabású funkcionális analízisének elősegítéséhez kifejlesztettünk két jelzőrendszert, amik antocianinok felhalmazozódásán, illetve a gümőzésre képtelen *nsp2* mutáns komplementálásán alapulnak és melyek alkalmasak a transzgenikus gyökerek és gümők felismerésére pusztán szemmel, kémiai kezelés vagy speciális gépek használata nélkül.

- Az *NCR* gének rendkívüli specifitása adta az ötletet a transzkripciós szabályozó elemeiknek felkutatására, hogy vajon ez a szabályzás specifikus e a *Medicago*-ra, az *NCR* peptideket termelő IRLC kládra vagy az összes hüvelyesre.

### **Alkalmazott módszerek**

Növényi technikák: Magfelszín sterilizálása, csíráztatás, “hairy root” transzformáció, növesztés *in vitro* körülmények közt és üvegházban.

Mikrobiális technikák: Táplemez készítése, kémiai- és elektrokompetens sejtek készítése és transzformálása, növény fertőzése.

Molekuláris biológiai technikák: Növényi DNS- és RNS-izolálás, bakteriális- és élesztő-plazmid kivonás, PCR, agaróz-, valamint denaturáló- és natív poliakrilamid

gélelektroforézis, elektroforetikus mobilitási eltolódási vizsgálat (EMSA), fehérje- és DNS pull-down.

## **Elért eredmények**

Új jelzőrendszerek fejlesztése „hairy root” transzformációhoz, ami a nagyszabású reverz genetikai kísérlethez szükséges.

A legnagyobb probléma az *NCR*-ek tanulmányozásában az, hogy túl sok van belőlük: ha további elengedhetetlenül fontos *NCR* géneket szeretnénk találni, ahhoz egy rendkívül nagymérvű génkiütéses kísérlet lenne szükséges, ahol az összes *NCR* gént egyesével kéne kiütni. Meg is kezdtük ezt a kutatást az általunk használt „hairy root” transzformációs rendszer optimalizálásával, elsősorban új jelzőrendszerek kifejlesztésével.

A „hairy root” transzformáció széleskörűen

használt módszer a hasznos (rhizóbiomok, mikorrhizális gombák), illetve a káros (növénypatogén baktériumok és gombák) mikrobák és a pillangósvirágú növények gyökere közti kapcsolat tanulmányozására. De az általánosan használt jelzőrendszerek, mint a GFP és a GUS, nem alkalmasak nagyléptékű vizsgálatokra, mivel ezeknél fluoreszcens mikroszkópra vagy kémiai kezelésre van szükség a jel érzékeléséhez, ami munka- és időigényes. Munkánk során kifejlesztettünk két új jelzőrendszert, ami lila színű antocianinok felhalmozódásán, illetve a gümőképzésre képtelen *nsp2* mutáns növény komplementálásán alapul. Az antocianin alapú rendszernél a túlexpresszált vagy az edénynyalábokra specifikus kifejeződésű MtLAP1 a transzgenikus gyökerek és/vagy gümők esetében lila elszíneződést okoz az antocianinok



felhalmozódása miatt és így a transzgenikus szövetek szabad szemmel is felismerhetőek. Az *NSP2* jelzőrendszer esetében, ahol a gén által kódolt transzkripciós faktor elengedhetetlen a gümőfejlődés elindulásához, a „hairy root” transzformálást a gümőzésre képtelen *nsp2* mutáns növényeken végezzük el. Az eljárás során kapott gümők minden esetben transzgenikusak és a fenotípusuk, illetve a növény fenotípusa a gümő genotípusától függ, például CRISPR/CAS9 génszerkesztés után. Ez a két rendszer szignifikánsan le tudja csökkenteni a transzgenikus gyökerek azonosításához szükséges munkaidőt, ráadásul a második rendszer alkalmazása során nincs jelen nem-transzgenikus szövet, így az nem járul hozzá a szimbiotikus fenotípushoz és a növény életképességét sem befolyásolja.

## Az *NCR* gének cisz- és transz hatású szabályozó elemeinek azonosítása

A több mint 700 *Medicago truncatula* *NCR* gén kifejeződése rendkívül specifikus, az átíródásuk a gyökérgümő szimbiotikus sejtjeire korlátozódik és eddig egy kipróbált kísérleti körülmény sem tudta kiváltani az aktivitásukat. Vélekedésünk szerint, igazán hasznos lenne felderíteni, hogy az *NCR* gének ezen szigorú szabályzása hogyan is valósul meg. Korábban azt feltételezték, hogy az *NCR* gének kifejeződését IRLC- vagy akár *NCR* specifikus transzkripciós faktorok irányítják. Ellenben az *NCR169* gén szójababban történő kifejeződését promóter-GUS fúziós rendszerrel vizsgálva azt találtuk, hogy a gén promótere aktív a szója gümőben, tehát a szójában és a *M. truncatula*-ban egyaránt jelen van az *NCR169* gén transzkripciós aktivátora. Ez az eredmény arra is utalhat, hogy az evolúció

során az *NCR* gének kialakulása nem *de novo* történt. A feltételezett transzkripció szabályozó elemek felkutatásának céljából ötvöztük a DNS affinitás kromatográfia, az élesztő-egy-hibrid (Y1H) és az EMSA módszereket, valamint felhasználtunk mind *Medicago*, mind szója gümő cDNS könyvtárakat. Azokat a lehetséges *NCR169* promóter interakciós partnereket választottuk ki a további kísérletekhez, melyek a DNS affinitás kromatográfia és az Y1H kísérletek esetében, valamint a *Medicago* és a szója mintáknál együtt fejeződtek ki az *NCR169*-el a gümő interzónájában és a nitrogén-kötő zónájában. Ezek az együttesen használt stratégiák több ígéretes jelöltet is adtak nekünk, melyeket jelenleg is vizsgálunk.

## Summary

- Egy antocianan alapú jelzőrendszert fejlesztettünk ki és teszteltünk, ami szabad szemmel is látható jelet ad.

- Létrehoztunk egy vektor alapú *Medicago truncatula nsp2* mutáns-komplementációs rendszert, ahol csak a transzgenikus gyökereken képesek gümők növekedni.

- Felfedeztük, hogy az *NCR169* gén aktiválódik szójában, ahol természetes körülmények között egy *NCR* gén sem található.

- Az *NCR* gének szabályzó elemeinek azonosításához kidolgoztunk egy munkafolyamatot, ami ötvözi a DNS affinitás kromatográfia, az élesztő-egy-hibrid és az EMSA technikákat.

- Azonosítottunk több potenciális transzkripciós faktort, amelyek részt vehetnek az *NCR169* gén szabályzásában.

## **Publikációs lista**

**Senlei Zhang**, Éva Kondorosi és Attila Kereszt. **2019**. An anthocyanin marker for direct visualization of plant transformation and its use to study nitrogen-fixing nodule development. *Journal of Plant Research*. 132(5), 695-703.

Zhengxi Sun, Youning Wang, Fupeng Mou, Yinping Tian, Liang Chen, **Senlei Zhang**, Qiong Jiang és Xia Li. **2016**. Soybean reveals auxin-responsive microRNAs that are differentially expressed in response to salt stress in root apex. *Frontiers in Plant Science*. 6, 1273

**Összesített IF: 6,380**