

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

című doktori értekezés tézisei

szerző:

Lima Rui Dániel

Témavezető: Prof. Dr. Kondorosi Éva

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biológia Doktori Iskola
ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Növénybiológiai Intézet



2023

Szeged

BEVEZETÉS

Pillangósvirágú növények és rhizobium talajbaktériumok szimbiózisa gyökérgümők fejlődéséhez vezet, ahol a gümősejteknél a baktériumok, az ún. bakteroidok képessé válnak a levegő nitrogénjének ammóniává történő redukálására. *Medicago truncatula* gümőben a bakteroidok terminális differenciáción mennek keresztül, mely során megsokszorozódik a genomjuk, megnyúlnak, méretük megnövekszik és elvesztik szaporodó képességüket, és így a gümőn kívül az életképességüket. Ezért az irreverzibilis átalakulási folyamatért a gazdanövény felelős és a folyamatos irányító növényi faktorok elsősorban a gümőspecifikus ciszteinben gazdag NCR peptidek. Az NCR-ek szekretált peptidek, amelyek 4 vagy 6 ciszteint tartalmaznak konzervált pozícióban, miközben aminosav sorrendjük rendkívül változatos. Az NCR gének kizárólag a gümő szimbiotikus sejtjeiben fejeződnek ki, de a gümő különböző fejlődési szakaszaiban és a bakteroidok membránjába vagy a citoszoljába lokalizálódnak. Az érett NCR peptidek változatos aminosav összetételük miatt nagyon eltérő

fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, míg az NCR szignál peptidek (NCR SP-ek) konzerváltak.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztük ki az NCR és NCR-szerű peptid családok evolúciójának, strukturális jellemzőinek és szabályozásuknak feltárását.

Elemeztük az NCR szignál peptidek (NCR SP) szerkezeti sajátosságait, konzerváltságukat, és ennek jelentőségét.

Vizsgáltuk a gümőspecifikus szignál peptid peptidáz, a nodSPP szerepét a szimbiózisban és kapcsolatát az NCR SP-ekkel.

Vizsgáltuk az NCR-ek antimikrobiális hatását különböző humán kórokozókval szemben.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Molekuláris biológiai módszerek

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR),
RNS-interferencia vektorok előállítás,

NCR169 promótert tartalmazó vektorok előállítása, transzkriptom-elemzés.

Növényi munka

Stabil és tranzienstanszgenikus *Medicago truncatula* növények előállítása.

Mikroszkópia

Sztereo mikroszkóp, konfokális mikroszkóp, pásztázó elektronmikroszkóp használata.

Biokémiai módszerek

GUS-festés, endoplazmatikus retikulum (ER) membránizolálás, szimbioszóma membránizolálás, western blot, affinitás kromatográfia.

Antimikrobiális módszerek

Antimikrobiális aktivitás vizsgálata, biofilm bontás vizsgálata, DNS-kötő vizsgálat, humán vörösvérsejtek hemolízisének vizsgálata.

EREDMÉNYEK

Az NCR247 hatásmechanizmusa

Egy review-ban (Lima és mtsai., 2020, *Frontiers in Microbiology*) összefoglaltuk, hogy az

- NCR247 magas koncentrációban károsítja a membránt. Alacsony koncentrációban, ahogy a gümőben is termelődik, membránkárosítás nélkül képes a bakteriális citoszolba lépni, ahol specifikusan kötődik a sejtosztódásban kulcsszerepet játszó FtsZ fehérjéhez, a GroEL chaperonhoz és több riboszómális és a translációban résztvevő fehérjéhez.
- Karakterizáltuk és összehasonlítottuk az IRLC NCR-eket és a Dalbergioid NCR-szerű-peptideket, több konzervált régiót és aminosavat is leírva bennük.

Az NCR gének szabályozása

Zhang és mtsai., 2023, *Nature Plants* cikk megállapításai között a következőkben vettem ki a részemem:

- az *NCR169* gén promótere olyan motívumokat tartalmaz, melyek 288 *NCR* promóterében is jelen vannak és gümős-specifikus kifejeződést biztosítanak.
- Kimutattuk, hogy az *NCR169* promóterrel szabályozott GUS riporter kifejeződik szója gümőben, ahol nincsenek *NCR* gének és nincs terminális bakteroid differenciáció.
- *NCR169* jelenlétében a szója szimbiótái a terminális differenciáció jeleit mutatták, mivel megfigyelhető volt a bakteroidok megnyúlása, valamint genomméretük kismértékű növekedése.
- Az *NCR*-ek szabályozását minden növényben előforduló AHL transzkripciós faktorok irányítják.

Az *NCR* szignál peptidek konzerválódása

Még nem közölt eredményeink alapján:

- Az *NCR* SP-k nagymértékben konzerváltak, különösképpen az endoplazmatikus retikulum (ER) membránba ágyazódó hidrofób *h*-régiójuk, és itt konzervált pozícióban található egy hélix-törő

szerin, mely hasítóhelyként szolgál a szignál peptid peptidáz (SPP) számára.

A gümőspecifikus szignál peptid peptidáz nélkülözhetetlen a *M. truncatula* gümő számára

Még nem közölt eredményeink alapján:

- A *M. truncatula* két szignál peptid peptidáz (SPP) paralógot kódol, melyek közül az egyik gümőspecifikus kifejeződésű (*nodSPP*) és a gümő csupán néhány sejtsor vastagságú interzónájában expresszál, ahol az NCR transzkriptumok 55%-a megtalálható.
- A *nodSPP* az NCR-ekkel együtt fejlődött ki az IRLC fajokban.
- Minden általunk tesztelt IRLC gümőben a *nodSPP* ortológoknak magasabb az expressziós szintje, mint az általános SPP ortológoknak és ez bizonyos összefüggést mutat az adott fajban található NCR gének számával.
- A *nodSPP* gén csendesítésével (*nodSPP* RNSi) kicsi, fehér és nitrogénkötésre képtelen Fix⁻ gümők jönnek létre. A bakteroidok megnyúlása

elkezdődik, de megreked az interzónában, ahonnan hiányzik a nodSPP. A nodSPP RNSi gümőkől izolált bakteroidok szignifikánsan kisebbek, mint a vad típusú gümőkől izolált bakteroidok, és méretben a szabadonélő baktériumokhoz állnak közelebb. A nodSPP RNSi gümő transzkriptom alapján a kontrollhoz képest szignifikánsan lecsökkent a leghemoglobin gén expressziója, ami működésképtelenné teszi a gümőt. Elmarad több mint 600 *NCR* gén indukciója, valamint a *GRP* génké is, amely egy másik, a szimbiózisban fontos szerepet játszó gümőspecifikus géncsalád. Lecsökkent azoknak a géneknek az expressziója is, amelyek révén a növény tolerálja a sejtjein belül élő szimbióta baktériumot. Ellenben több száz védekezésben és lebontásban szerepet játszó enzimet kódoló gén expressziója megnőtt, akár 50 vagy 100-szorosan is. Ezek a transzkripciósváltozások arra utalnak, hogy a nodSPP hiányában a gazdanövény kórokozóként azonosítja és elpusztítja a rhizóbiumot.

Az SPP-t tartalmazó ER membrán elhasítja az SPP szubsztrátnak vélt NCR SP-eket

Még nem közölt eredményeink alapján:

- Az izolált ER membrán elvágja azokat a NCR SP-eket, amiket SPP szubsztrátnak véltünk (NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP), tehát az ER membránba ágyazódó hidrofób *h*-régiójukban hélix-törő szerint vagy ciszteint tartalmaznak, míg az SPP célpontnak nem tekintett NCR247 SP érintetlen maradt.
- Affinitás kromatográfia alapján az SPP szubsztrát és nem szubsztrát NCR SP-eknek különböző kölcsönható fehérjepartnereit azonosítottuk. 37 darab fehérje csak a három SPP szubsztrát NCR SP esetében jött ki, köztük több sejtmagban kódolt mitokondrionális fehérje, valamint a proteaszóma több eleme, mely komplexnek feladata a SP-k lebontása. A nem-SPP szubsztrát NCR247 SP partnereinek 86%-a nem volt jelen az SPP célpont peptideknél. A találatok közt több sejtmagban kódolt amiloplaszt fehérjét, valamint a szignalizóma több elemét találtuk meg és több

kalmodulint, köztük egy szimbiotikus kalmodulin-szerű fehérjét. Mind a szignáloszóma, mind a kalmodulin jelátviteli útvonalak fontos szabályozói és ismert, hogy a kalmodulinnak partnere az SPP által felszabadított preprolaktin szignál peptid fragment.

Az NCR-ek antimikrobiális hatása

Lima és mtsai., 2022, *Frontiers in Molecular Biosciences* cikkünkben

- 98 NCR-t, illetve rövidebb származékukat teszteltük nyolc humán kórokozón.
- A 98 peptidből 44 volt aktív legalább egy patogén ellen.
- A legtöbb aktív peptid kationos és a nettó töltése +5 feletti volt, így kapcsolatba léphetnek a negatív töltésű bakteriális membránnal.
- A legtöbb aktív peptid rendezetlen szerkezetű és amfipatikus, így nagyobb valószínűséggel vesznek fel másodlagos szerkezetet a víz-membrán határfelületen, ami szintén kedvez az antimikrobiális hatásnak.

- Több aktív NCR peptid hasonló fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkező homológia is inaktív volt, ami mutatja, hogy az aminosav sorrend szintén rendkívül fontos meghatározója az antimikrobiális tulajdonságnak.

SUMMARY

We reviewed the mechanism of action of the *Medicago truncatula* NCR247. NCR247 damages the membrane at high concentrations, but at low concentrations, it can enter the bacterial cytosol without damaging the membrane, where it binds the cell division regulator FtsZ, the GroEL chaperone and ribosomal proteins.

The GUS reporter gene regulated by *NCR169* promoter is expressed in transgenic soybean nodules. Expression of *NCR169* in soybean nodules caused the elongation and slight genome amplification of the soybean. The expression of *NCRs* is regulated by common AHL transcription factors present in every plant, which gives us the opportunity to express *NCRs* in other plants, inducing terminal bacteroid differentiation and possibly improving nitrogen fixation.

We found that NCR SPs are highly conserved particularly in their hydrophobic *h*-region embedded in the endoplasmic reticulum (ER) membrane where a helix-breaking serine is conserved and serves as a cleavage site for the signal peptide peptidase (SPP). *M. truncatula* has two SPPs and the nodule specific paralog, *nodSPP*, is co-expressed with most of the *NCR*s. *NodSPP* is essential for the normal function and development of the *M. truncatula* nodule as the *nodSPP* RNAi nodule is small, white, the bacteroids in these nodules are unable to fix nitrogen and are destroyed by the plant, which is not able to recognize them as symbionts.

The isolated SPP containing ER membrane cleaves NCR SPs containing helix-breaking amino acids in their *h*-region (NCR120 SP, NCR216 SP, NCR252 SP), while the non-SPP substrate NCR247 SP remains intact. The SPP substrate NCR SPs interact with mitochondrial proteins and the proteasome, while the non-SPP substrate NCR247 SP interact with amyloplast proteins, the COP9 signalosome and calmodulins, and through the latter two possibly interfering with signaling pathways.

We tested 98 synthetic NCR peptides and their shorter derivatives on eight human pathogens, including multidrug-resistant ESKAPE pathogens. Most of the active peptides are cationic and have a net charge above +5, which features likely contribute to their interaction with the negatively charged bacterial membranes. Disordered structure and amphipathicity are also characteristic of active peptides, as these properties make easier to take up secondary structure at the water-membrane interface, which also favours antimicrobial activity. These properties can make NCR peptides excellent antibiotic substitutes.

Tudományos közlemények

MTMT azonosító: 10044677

Összesített impakt faktor: 62,495

1. **Rui M. Lima**, Balaji Baburao Rathod, Hilda Tiricz, Dian H. O. Howan, Mohamad Anas Al Bouni, Sándor Jenei, Edit Tímár, Gabriella Endre, Gábor K. Tóth, Éva Kondorosi: Legume Plant Peptides as Sources of Novel Antimicrobial

Molecules Against Human Pathogens (Frontiers in Molecular Biosciences, 2022: doi: 10.3389/fmolb.2022.870460)

IF: 5.246

2. **Rui M. Lima**, Salome Kylarová, Peter Mergaert, Éva Kondorosi: Unexplored arsenals of legume peptides with potential for their applications in medicine and agriculture (Frontiers in Microbiology, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01307)

IF: 4.236

3. Senlei Zhang, Ting Wang, **Rui M. Lima**, Aladár Pettkó-Szandtner, Attila Kereszt, J. Allan Downie, Éva Kondorosi: Widely conserved AHL transcription factors are essential for NCR gene expression and nodule development in *Medicago* (Nature Plants, 2023: doi: 10.1038/s41477-022-01326-4)

IF: 17.352

4. Sándor Jenei, Hilda Tiricz, János Szolomájer, Edit Tímár, Éva Klement, Mohamad Anas Al Bouni, **Rui M. Lima**, Diána Kata, Mária Harmati, Krisztina Buzás, Imre Földesi, Gábor K. Tóth, Gabriella Endre és Éva Kondorosi: Potent chimeric antimicrobial derivatives of the *Medicago truncatula* NCR247 symbiotic peptide (Frontiers in Microbiology, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00270)

IF: 4.236

5. Attila Farkas, Gergely Maróti, Hajnalka Dürögő, Zoltán Györgypál, **Rui M. Lima**, Katalin F. Medzihradszky, Attila Kereszt, Peter Mergaert, Éva Kondorosi: *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, doi: 10.1073/pnas.1404169111)

IF: 9.737

6. Hilda Tiricz, Attila Szűcs, Attila Farkas, Bernadett Pap, **Rui M. Lima**, Gergely Maróti, Éva Kondorosi, Attila Kereszt: Transcriptome analysis of bacteria challenged with antimicrobial peptides of plant origin (Applied and Environmental Microbiology, 2013, doi: 10.1128/AEM.01791-13)

IF: 3.678

7. Emil Nyerki, Tibor Kalmár, Oszkár Schütz, **Rui M. Lima**, Endre Neparáczki, Tibor Török & Zoltán Maróti: correctKin: an optimized method to infer relatedness up to the 4th degree from low-coverage ancient human genomes (BMC Genome Biology, 2023: doi: 10.1186/s13059-023-02882-4)

IF: 18.010

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Kondorosi Éva, mint a közlemények felelős szerzője igazolja, hogy Lima Rui Dániel PhD jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló hat 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.

Szeged, 2023. 04. 04.



Prof. Dr. Kondorosi Éva

témavezető