

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

Ph.D. értekezés tézisei

Bozsóki Zoltán

TÉMAVEZETŐ:  
Dr. Endre Gabriella  
tudományos főmunkatárs

MTA SZBK, Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola  
SZTE TTIK

2017  
SZEGED

## Bevezetés

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. 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 talajlakó gombákkal kialakított arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózis. Ennek révén elsősorban foszfátvegyületekhez jut a növény. Kialakulását mintegy 460 millió évvel ezelőttre, az első szárazföldi növények megjelenésével közel egy időre datálják, és azóta is jelen van a szárazföldi növényfajok túlnyomó többségében. A mikorrhiza szimbiózis kialakításának képessége feltételezhetően már jelen volt a szárazföldi növények közös őséiben is, vagyis azok a fajok, melyek ma nem léphetnek szimbiózisra mikorrhiza gombákkal, ezen képességüket elvesztették az evolúciójuk folyamán. Emellett egy másik, jóval később létrejött szimbiotikus együttélési forma is megjelent növények és nitrogénkötő talajbaktériumok között. A nitrogénkötő szimbiózis képessége vélhetően többször is kialakult a szárazföldi növények törzsfejlődése során (először mintegy 65 millió évvel ezelőtt), ám minden esetben rokon növényfajok egy szűk csoportján: a Fabales, Fagales, Cucurbitales és Rosales kétszikű (Dicotidae) kládokon belül. A nitrogénkötő szimbiózis kialakítására képes növények legnagyobb arányban a pillangósvirágúak (Leguminosae vagy Fabaceae, Fabales), csoport fajai között fordulnak elő. A nitrogénkötő endoszimbiózis kialakítása folyamán egy új növényi szerv képződik, a gyökérgümő. A szimbióta baktériumok ebben végzik a légköri dinitrogén ammóniává történő redukcióját, mely a növény számára is hasznosítható szerves molekulákba épül be.

A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása és működése során lejátszódó folyamatokat irányító növényi gének közül már számos gént, illetve génterméket leírtak. Ezeket elsősorban két pillangósvirágú, nitrogénkötő modell növény: a lucerna egy közeli, mediterrán elterjedésű rokona, a *Medicago truncatula* (*Mt*) és a szarvaskerep egy közeli rokona, *Lotus japonicus* (*Lj*) vizsgálatával azonosították. Főként a szimbiotikus kapcsolat kialakulásának kezdeti lépéseiben szerepet játszó géneket ismerjük már. Tudjuk, hogy a bakteriális jelmolekulák érzékeléséhez és a szimbiotikus jelátviteli útvonal aktiválásához LysM típusú receptor kinázok (*MtLYK3*, *MtNFP*, *LjNFR1*, *LjNFR5*) és egy LRR ismétlődéseket is tartalmazó receptor kináz (*Medicago sativa* NORX/*MtDMI2*/*LjSYMRK*) működése szükséges, mely a gyökérszőr sejtmagjának

környezetében kalciumszint ingadozás kiváltásához vezet. Ez a jellegzetes periodikus kalciumszint oszcilláció nukleáris pórus komplex elemek (LjNUP133, LjNUP85) és egy feltételezett kation csatorna (MtDMI1/LjCASTOR és LjPOLLUX) közreműködésével jön létre, s szignálként szolgál a további folyamatokhoz. Ennek dekódolását egy sejtmagi kalciumkalmodulin függő protein kináz (MtDMI3/LjCCaMK) végzi egy kölcsönható partnerrel együtt (MtIPD3/LjCYCLOPS), és különböző transzkripciós faktorok (MtNSP1/LjNSP1, MtNSP2/LjNSP2, MtERN, MtNIN/LjNIN) felé továbbítja a jelet. Az *LjNAPI/MtRIT* és *LjPIR1* gének a szimbióta baktérium intracelluláris infekcióját elősegítő növényi struktúra, az ún. infekciós fonal kialakítása és haladása folyamán bekövetkező aktin-sejtváz átrendezésben vesznek részt. 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. E szimbiotikus jelátviteli hálózat kapcsolatot létesít a növény citokinin szignalizációs útvonalával is, egy a szimbiotikus nitrogénkötéshez nélkülözhetetlen citokinin receptor (MtCRE1/LjLHK1) révén. A növény a szimbiózis kialakításának és fenntartásának teljes ideje alatt szigorúan, de dinamikusan képes szabályozni a képződő gümők számát, mely folyamatban további LRR-receptor kinázok vesznek részt (LjHAR1/MtSUNN és LjKLV).

A mikorrhiza szimbiózis kialakításához szükséges növényi génekkel kapcsolatos ismereteink javarészt a nitrogénkötő 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. Ezeket nevezzük a közös szimbiotikus útvonal génjeinek, melynek azonosított tagjai: *MsNORK/MtDMI2/LjSYMRK*, *MtDMI1/LjCASTOR* és *LjPOLLUX*, *LjNUP133*, *LjNUP85*, *MtDMI3/LjCCaMK* és *MtIPD3/LjCYCLOPS*. A jelenleg elfogadott tudományos nézet szerint feltételezhető, hogy az ősbibb mikorrhiza rendszer már meglévő molekuláris apparátusának bizonyos elemeit felhasználva fejlődött a nitrogénkötő endoszimbiózis.

Az eddigi vizsgálatok több E3 ubikvitin ligázzal bizonyították, hogy fontos szerepe van a nitrogénkötő szimbiózis különböző szakaszaiban. Egyikük a *Medicago truncatula* modell növényben azonosított *LIN*, illetve *Lotus japonicus* ortológja, a *CERBERUS*. 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. A nitrogénkötő szimbiózis kialakítása a *lin* 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 funkciónyeréses (autoaktív) formájáról bebizonyították, hogy spontán gümözést indukál szimbionta baktérium hiányában is a vad típusú növényeken. Amikor ezen autoaktív kalcium-kalmodulin függő protein kináz kópiával transzformálták a *lin* és *cerberus* mutáns növényeket, azok is képesek voltak spontán gümők létrehozására, ami arra utal, hogy LIN/CERBERUS a szimbiotikus infekcióhoz nélkülözhetetlen, míg a gümőképződéshez önmagában nem az. Bár a *lin* és *cerberus* mutánsok megtartják mikorrhizációs képességüket, a közelmúltban a *L. japonicus cerberus* mutáns növények gyökerén csökkent mikorrhiza kolonizációt mutattak ki, ami a CERBERUS mikorrhizációban betöltött esetleges szerepére utalhat.

Jelen tanulmány két nagy, egymást kiegészítő egységre bontható. Publikus adatbázisok felhasználásával számos növényfajból gyűjtöttük össze a szimbiotikus gének homológjait, melyeken informatikai eszközökkel összehasonlításokat végeztünk, azt vizsgálva, hogy milyen módosulásokon mentek keresztül az egyes géntermékek, míg a nitrogénkötő szimbiózis működőképes részévé váltak. 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.

## Célkitűzések

Számos olyan növényi gén ismert már, mely a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához elengedhetetlen. Ezek némelyikét csoportunkban azonosították. Jelenleg is ezek vizsgálata jelenti a csoport elsősorú 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 zárwatermő 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 nevezünk 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.

# Alkalmazott módszerek

## 1. Bioinformatikai módszerek

- Adatgyűjtés publikus szekvencia adatbázisokból, a töredék szekvenciák összerendezése, konszenzus megállapítása
- Kódoló szekvenciák predikciója (FGENESH+)
- Szekvenciák minőségellenőrzése (Vector NTI, AlignX), manuális javítása
- Többszörös szekvencia illesztések, filogenetikai fa számolása (MEGA, ClustalW)
- Szinténia analízis (SyMAP)

## 2. Laboratóriumi módszerek

- Növényi genomi DNS és RNS tisztítás, cDNS szintézis
- Polimeráz láncreakciók (PCR)
- Molekuláris klónozás: konstrukciók készítése promóter analízis, fehérje lokalizációs és mutáns menekítési kísérletekhez
- *Agrobacterium rhizogenes* közvetített *M. truncatula* „hairy root” gyökértranszformációk
- *Agrobacterium tumefaciens* közvetített *Nicotiana benthamiana* tranziens levéltranszformációk
- Fluoreszcens konfokális lézer pásztázó- és fénymikroszkópia.
- Hisztokémiai festések (X-Gal, GUS)
- Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

## Eredmények és következtetések

Az elmúlt évtized kutatómunkájának köszönhetően mára számos, a nitrogénkötő szimbiózis kialakításában kulcsszerepet játszó növényi gént ismerünk. Vizsgálatunkhoz 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 kontrollként alkalmaztunk.

- A kiválasztott *M. truncatula* szimbiotikus és kontroll gének fehérjetermékeinek szekvenciájával adatbáziskereséseket végeztünk a zárwatermők 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. A vizsgált fajok mindegyike képes mikorrhiza szimbiózis kialakítására, egyedül az *A. thaliana* 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. Eredményeink alapján az *A. thaliana* genomból hiányoznak a *LYK3*, *NFP*, *DMI3* és *IPD3* ortológ szekvenciák, továbbá egyik vizsgált egyszikű genom sem kódolja a *LYK3* ortológját, míg a feltételezett ortológ a kétszikűekben általánosan jelen van. Feltételezzük, hogy a pillangósvirágúak nitrogénkötő szimbiózisban szereplő *LYK3* ortológ kópiája csak az egyszikű és kétszikű fejlődési vonalak elválása után jelent meg a növények törzsfajlódása során. 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 törzsfajlódása során elveszítette. 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, így megmaradásuk az *A. thaliana* genomban szükségszerű volt.
- Az összegyűjtött leghasonlóbb szekvenciákat először hosszukban hasonlítottuk össze annak eldöntésére, hogy történtek-e nagyobb, akár teljes domén(eke)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 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 zárwatermő növények evolúciója során, szekvenciája jól konzervált. Mivel szekvenciája a gümőző 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 gümőző fajokból vett ortológok megfelelő kifejeztetés mellett nagy eséllyel képesek ellátni a gümőző növényekben a szimbiotikus feladatokat. Ezt a szakirodalomban elérhető transz-komplementációs kísérletek eredményei megerősíteni látszanak. A **B**, illetve **B'** csoportba azok a szekvenciák tartoznak, amelyek jelentős ID érték csökkenést mutattak a gümőző és nem gümőző 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 gümőző 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 ezeknek a fehérjéknek a nem-gümőző 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 gümőző 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 gümőző 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.

A LIN géncsalád tagjaival egy részletesebb filogenetikai elemzést és funkcionális vizsgálatokat végeztünk. A *M. truncatula* LIN gén egy, a nitrogénkötő endoszimbiózis kialakításában nélkülözhetetlen szerepet játszó fehérjét kódol. 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. Ennek a paralóg géncsaládnak a tagjait LIN2-nek neveztük el. A LIN és LIN2 fehérjék doménfelépítésükben igen hasonlóak: tartalmaznak egy U-box és egy Armadillo domént, valamint több WD40 domént. Feltételezhetően E3 ubikvitin ligázok.

- 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 LIN és egy LIN2 ortológot találtunk. A szekvenciák között fennálló ortológ/paralóg viszonyt a szekvencia hasonlóságon túl, az elérhető szekvenciák felhasználásával készült Neighbor-Joining filogenetikai fa topológiája, és a géneket hordozó kromoszóma szakaszok összevetésével végzett szinténia vizsgálat is megerősíti. 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 zárvatermők 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 ősének genomjában. Emellett

valószínűsíti, hogy vagy bizonyos egyszikű vonalak, vagy akár már az egyszikűek közös őse elveszítette a *LIN* kópiát. Ennek eldöntéséhez további befejezett egyszikű genomszekvenciák szükségesek, az egyszikűek különböző leszármazási vonalaiból.

A *LIN* gén nitrogénkötő szimbiózis során végzett működésének evolúciós vizsgálatához nem gümöző fajok *LIN* ortológjait használtuk.

- Klónoztuk a *M. truncatula* *LIN* fehérje ortológját a kétszikű szőlő (*Vitis vinifera*), és a vénuszhaj páfrány *Adiantum capillus-veneris* fajokból is, melyek 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 sejtosztódásuktól 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 előfutaraként az infekciós fonal előrehaladásának útját övező sejtekben, de annak mindig előtte járva kapcsolt be, míg a baktériumok el nem érték a gümőprimórdiumot. Ez a mintázat nem zárja ki, hogy a *LIN2* fehérjének is lehet szerepe a szimbioták infekciója folyamán (is). A *LIN2* promóter működése igen hasonló képet mutatott a *M. truncatula LIN*, és *L. japonicus* ortológja a *CERBERUS* gének gümőkben tapasztalt promóteraktivitásához. A *LIN2* gén kifejeződésének kvantitatív RT-PCR-rel történő vizsgálata nagyon alacsony mRNS szintet mutatott gyökérben, mely úgy mutatott szignifikáns emelkedést a szimbiota inokuláció után, hogy még így is feltehetőleg messze elmarad a *LIN* gén transzkript szintjétől. A *LIN2* gén kifejeződése tehát szigorúan szabályozott.

- Heterológ rendszerben végzett lokalizációs vizsgálatokkal, *N. benthamiana* levélen, a *M. truncatula* LIN2 fehérjét kimutattuk a sejtmagban, az endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában 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. 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 több, a *LIN2* génben Tnt1 retrotranszpozont 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 maszkolja a *lin-2* mutánsokban a LIN2 géntermék kiesésének következményeit. Ez, legalábbis részben, fordított módon is elképzelhető. A *lin* mutáns növényekben, melyekben csak a *LIN* hibás és a *LIN2* ép formában 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. Ezek a funkciók nem vesznek el a *lin* mutánsokban sem. Vizsgálatukhoz *lin lin2* kettős mutánsokra van szükség, melyek előállítása már folyamatban van. Ilyen redundáns funkciót tölthet be a paralóg pár a mikorrhiza szimbiózis folyamán. A közelmúltban a *LIN* ortológ *L. japonicus cerberus* mutáns gyökerek csökkent mikorrhiza kolonizációját mutatták ki. Elképzelhető, hogy a *cerberus* mutáns mikorrhizációs fenotípusa a géndózis csökkenésének következménye, és a *LIN2* gén kiesésével a fenotípus súlyosabbá válna, és teljesen elveszne a növények mikorrhizációs képessége.

Az általunk végzett vizsgálatok segíthetnek megérteni a nitrogénkötő szimbiózishoz szükséges gének fejlődését a növények evolúciója folyamán. A folyamatot, mely által bizonyos növény fajok képessé váltak létrehozni egy olyan szimbiózist, melyben képesek a fejlődésükhöz szükséges nitrogént a légkörben nagy mennyiségben jelen lévő elemi nitrogénből nyerni, ezáltal függetlenné válhattak a talajban korlátozottan elérhető szerves nitrogén készlettől.

## Közlemények jegyzéke

(MTMT azonosító: 10024923)  
(ORCID: 0000-0002-4267-9969)

### KÖZLEMÉNYEK

#### A fokozatszerzési eljárás alapjául szolgáló közlemények:

**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  
(IF: 9.661 - 2016-ban)

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 Pi Deficient White Lupin Reveals Novel Insights Into Phosphorus Acclimation in Plants**. Plant Physiol **161**: 705–724  
(IF: 6.535)

#### Egyéb folyóirat közlemény:

Pénzes Zs, Melika G, **Bozsóki Z**, Bihari P, Mikó I, Tavakoli M, Pujade-Villar J, Fehér B, Fülöp D, Szabó K, et al (2009) **Systematic re-appraisal of the gall-usurping wasp genus Synophrus Hartig, 1843 (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini)**. Syst Entomol **34**: 688–711  
(IF: 2.467)

Összesített IF: 18.663

#### Egyéb könyvfejezet:

Melika G, Pénzes Zs, Mikó I, Bihari P, Ács Z, Somogyi K, **Bozsóki Z**, Szabó K, Bechtold M, Fári K, Fehér B, Fülöp D, Csóka Gy, Stone GN (2007). **A Kárpát-medence tölgyön élő gubacsdarazsai**. In: Forró L (szerk.) A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása: A Kárpát-medence állattani értékei és faunájának kialakulása. 399 p. Budapest: Magyar Természettudományi Múzeum, 2007. pp. 165-174.  
(ISBN:978-963-7093-99-9)

#### A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SZAKMAI ANYAGOK

##### Konferencia előadások:

**Bozsóki Z**, Kiss E, Oláh B, Endre G- **Homologs of *Medicago truncatula* symbiotic proteins and the evolution of nitrogen fixing root nodule symbiosis**  
First Legume Society Conference, 2013 május, Újvidék, Szerbia

**Bozsóki Z**, Kiss E, Endre G- **Szimbiotikus gének rokonai a növényvilágban**  
Magyar Növénybiológiai Társaság - Fiatal Növénybiológusok Előadássorozata, 2013 január, Szeged

**Bozsóki Z**, Kiss E, Oláh B, Endre G- ***Medicago truncatula* szimbiotikus gének homológjainak szerkezeti és működésbeli vizsgálata**  
"Genetikai műhelyek Magyarországon" VIII. minikonferencia, 2009 szeptember, Szeged

## **Poszter prezentációk:**

### **Homologs of *Medicago truncatula* symbiotic proteins in plants**

Hungarian Molecular Life Sciences conference, 2013 április, Siófok

### **How could the *LIN* gene and its function evolve for symbiosis?**

10<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference, 2012 szeptember, München, Németország

### **Szimbiotikus gének evolúciós vizsgálata**

IX. Magyar Genetikai Kongresszus / XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011 március, Siófok

### **Homologs of *Medicago truncatula* symbiotic genes in taxonomically distant species from nodulating to non-symbiotic plants**

9<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference, 2010 szeptember, Genf, Svájc

### **Homologs of *Medicago truncatula* symbiotic genes in taxonomically distant species from nodulating to non-symbiotic plants**

European Plant Science Organisation 5<sup>th</sup> EPSO Conference “Plants for Life”, 2010 augusztus, Olos, Finnország

### **Studies on the homologous counterparts of *Medicago truncatula* symbiotic genes in nodulating and non-nodulating plant species**

8<sup>th</sup> International Symposium in the series Recent Advances in Plant Biotechnology, “New development in green gene technology”, 2009 szeptember, Szeged

### **Structural analyses on *Medicago truncatula* symbiotic gene homologs in nodulating and non-nodulating plant species**

Model Legume Congress, 2009 június, Asilomar, CA, USA

### ***Medicago truncatula* szimbiotikus gének homológjainak szerkezeti és működésbeli vizsgálata gümöző és nem gümöző növényekben**

VIII. Magyar Genetikai Kongresszus / XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2009 április, Nyíregyháza

## **EGYÉB SZAKMAI ANYAGOK**

### **Konferencia előadás:**

### **Bozsóki Z, Cheng J, Blaise M, Stougaard J, Radutoiu S- Symbiosis or defense: The molecular mechanism involving LysM receptors of the model legume *Lotus japonicus***

12<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference, 2016 augusztus, Budapest (villámelőadás)

### **Poszter prezentáció:**

### **A *Lotus japonicus* LysM kinase is a chitin receptor**

2<sup>nd</sup> International Molecular Mycorrhiza Meeting, 2015 szeptember, Cambridge, UK