



Szimbiózis-specifikus gének expresszió- és ploideaszt szint szerinti epigenetikai változásainak vizsgálata

A DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Nagymihály Marianna

Témavezetők:

Dr. Peter Mergaert, I2BC, Gif-sur-Yvette

Dr. Kereszt Attila, BRC, Szeged,

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

és

ÉCOLE DOCTORALE, SCIENCES DU VÉGÉTAL

UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

2017

I. BEVEZETÉS

A pillangósvirágú növények képesek szimbiózist kialakítani talajlakó *Rhizobium* baktériumokkal, mely interakció következtében egy új növényi szerv, a szimbiotikus gyökérgümő jön létre. A gümősejtekben a rhizobiumok képesek a légköri nitrogén megkötésére és ammóniává alakítására, ami kiváló nitrogénforrás a növény számára. A pillangósvirágú *Medicago truncatula* szimbiotikus gümősejtjei differenciálódásuk során endoreduplikáción és jelentős transzkripciós átprogramozáson mennek keresztül (Maunoury et al. 2010). A szimbiotikus sejtek merisztematikus sejtek osztódásával jönnek létre, ahol a post-merisztematikus sejt kilép a sejtosztódási ciklusból és belép egy úgynevezett endoreduplikációs ciklusba, ami egy módosult sejtciklus a genom folyamatos replikációjával, melyet nem követ mitózis illetve citokinézis, aminek eredményeként megnövekedett, poliploid sejtek jönnek létre. A differenciálódott szimbiotikus sejt mérete 80-szor nagyobb és ploidia szintje 64C (C a haploid sejt DNS tartalma), a diploid (2C) merisztematikus sejthez képest. A *Rhizobium* baktériumok a differenciálódó szimbiotikus sejteket folyamatosan fertőzik, létrehozva a növényi sejteken belül a szimbioszómákat, melyek táplálják a mikroszimbiontát és felveszik, valamint szállítják a bakteroidok által kötött nitrogént. A *M. truncatula* gümő típusát tekintve indeterminált, ahol a merisztéma folyamatos aktivitása következtében a sejtek újabb és újabb generációja alakul ki, és fertőződik meg a szimbionta baktériumokkal. A folyamatos merisztematikus aktivitás így egy fejlődési gradiens kialakulását eredményezi, ami alapján 5 zónát különíthetünk el a gümőben: apikális merisztéma (ZI), inváziós zóna (disztális ZII_d, és proximális ZII_p), interzóna (IZ), nitrogénfixáló zóna (ZIII) valamint idősebb gümők esetében a szenescens zóna (ZIV).

A gyökérgümő kialakulása során különböző, térben- és időben aktiválódó transzkripciós hullámokat azonosítottak (Manoury et al. 2010). Az első transzkripciós hullám során a „befogadó” gümő kialakításáért felelős gének aktiválódnak, míg a második hullámban a „működő” gümő kialakításában szerepet játszó gének. Habár számos gümő-indukált gén más növényi szövetben is kifejeződik, a gyökérgümőben aktív gének jelentős hányada szövet specifikus, köztük a *Gümő-Specifikus Cisztein-Gazdag* (*Nodule-Specific Cysteine-Rich, NCR*) peptid gének is. A szimbiotikus sejtek több száz különböző NCR peptidet termelnek, melyek fontos szerepet játszanak az endoszimbionta baktériumok, megnyúlt, poliploid, nitrogénkötő bakteroidokká történő átalakulásában. Az *NCR* gének szigorú transzkripciós kontroll alatt állnak, mivel kizárólag a szimbionta baktériumok által fertőzött poliploid sejtekben expresszálódnak (Van de Velde et al. 2010; Maunoury et al. 2010; Mergaert et al. 2003) ami

arra utal, hogy összefüggés van az endoreduplikáció és az *NCR* gének aktivációja közt. Azt, hogy az endoreduplikáció illetve a genom ploidia szintje hogyan szabályozza a génexpressziót, nem ismert. Felvetődik, hogy az *NCR*-ek és más gümő-specifikus gének transzkripció szabályozása a genomban végbemenő epigenetikai módosítások és endoreduplikáció által szabályozott. A nemrég publikált DNS demetiláz DEMETER (MtDME) *M. truncatula* gümőfejlődésében betöltött szerepe is ezt az elméletet támogatja (Satge et al. 2016).

Az 5-metil citozin (mC) DNS metiláció és hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításai együttesen vagy önmagukban a kromatin strukturális felépítésének fontos meghatározói és ezáltal befolyással vannak a génexpresszió szabályozásra. A mC bázis szekvencia kontextusa (CG, CHG, CHH, ahol H=A, C vagy T) illetve elhelyezkedése a promóter-, kódoló- vagy 3' szabályzó régióban különböző hatással van a génexpresszióra. Általában, pozitív korreláció figyelhető meg a promóterben előforduló DNS metiláció és az alacsony vagy gátolt génexpresszió között (Zhang et al. 2006; Zilberman et al. 2007; Cokus et al. 2008; Garg et al. 2015). A hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításai közül a hiszton H3 lizin 27 tri-metilációnak (H3K27me3) (Feng & Jacobsen 2011) van represszív, gátló hatása és jellemzően szövet specifikus gének szabályozásában vesz részt (Zhang et al. 2007), míg a hiszton H3 lizin 9 acetiláció (H3K9ac) pozitívan befolyásolja a génexpressziót (Kurdistani et al. 2004; Schubeler et al. 2004; Roh et al. 2005; Zhou et al. 2010).

A *M. truncatula* kitűnő modell növény a transzkripció átprogramozás tanulmányozására, mivel a gyökérgümőben megtalálható a szimbiotikus sejtdifferenciálódás összes fázisában levő sejt, a differenciálatlan merisztematikus sejtektől kezdve a poszt-mitotikus 4C és az átmeneti differenciálódási fázisban levő 8C-16C ploidiaszintű sejteken át az érett szimbiotikus sejtekig, melyek DNS tartalma 32C-64C között van (Vinardell et al. 2003; Maunoury et al. 2010). A gümő e tulajdonsága lehetővé teszi a sejtmagok ploidiaszint (DNA tartalom) szerint történő elválasztását áramlási citométer és sejt szorter segítségével, azaz a különböző fejlődési stádiumban levő gümő sejtmagokban végbemenő transzkripció átprogramozás tanulmányozását.

A szimbiózis-specifikus gének jelentős gümő-specifitása és transzkripció aktiválódásuk a magas DNS tartalmú, endoreduplikálódott gümősejtekben felveti, hogy epigenetikai módosítások, mint például DNS metiláció és/vagy hiszton modifikáció(k) szerepet játszhatnak a szimbiotikus gümősejt-specifikus transzkripció program szabályozásában. Represszív kromatin modifikációk negatívan befolyásolják a gének expresszióját, és megakadályozzák a transzkripció faktorok kötődését a DNA molekulához, míg ezen modifikációk eltávolítása elősegíti szimbiotikus sejt-specifikus expressziójukat. Továbbá,

feltételezzük, hogy a szimbiotikus sejtekben végbemenő endoreduplikáció is jelentős szerepet játszik a gümő-specifikus génexpressziós program kialakításában. Az endoreduplikáció aktívan részt vehet a represszív módosítások eltávolításában szerepet játszó fehérjék aktiválásában illetve a represszív módosítások passzív elvesztésével (melyek normál esetben másolódnak egyik ciklusról a másikra) az egymást követő endoreduplikációs ciklusok során. Ezen hipotézisek adják jelen dolgozat alapját.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A. Gümő-Specifikus Cisztein-Gazdag (NCR) gének expresszió vizsgálata *M. truncatula*ban.

1. A *Medicago truncatula* Génexpressziós Atlasz (MtGEA) (Benedito et al. 2008; He et al. 2009) jelenleg a legnagyobb transzkriptóm adatbázis, mely a teljes *Medicago* genomot lefedő Affymetrix Gene Chippel végzett vizsgálatokból származik és mely expressziós adatokkal szolgál a legtöbb *Medicago* génről (50,900 hibridizációs próba), számos kísérleti körülmény között (267), beleértve a különböző növényi szerveket, szöveteket, biotikus- és abiotikus stressz kondíciókat. Jelenleg ez az adatbázis tartalmazza a legtöbb expressziós adatot és ezáltal a legjobb forrás az NCR gének expressziós mintázatának és specificitásának vizsgálatára különböző kísérleti feltételek mellett.
2. A *M. truncatula* indeterminált gümőben jól elhatárolt hisztológiai zónák figyelhetőek meg, mely felveti, hogy az NCR-ek időbeli aktiválódása pozitív korrelációt mutat térbeli expressziójukkal az egyes zónákban. Ahhoz, hogy teszteljük a hipotézis, 4-hetes gümőket vágunk 5 különböző részre (gondosan elkülönítve az egyes zónákat, ZI, ZII_d, ZII_p, IZ, ZIII), és hasonlítottuk össze az e mintákból származó transzkriptómot korábban publikált génexpressziós adatokkal.
3. Annak érdekében, hogy validáljuk az MtGEA-ból származó expressziós adatokat, stabil transzgénikus *M. truncatula* R108 vonalakat használtunk, melyek tartalmazták 3 eltérően expresszáló NCR gén promóter- β -glükuronidáz riporter (GUS) konstrukcióját. Továbbá egy NCR peptid lokalizációját vizsgáltuk specifikus ellenanyag segítségével a gümőben.
4. Mivel az MtGEA adatbázis csak gyökér patogénekkal végzet kísérletekből származó expressziós adatokat tartalmaz, kíváncsiak voltunk, hogy más kórokozók - melyek a növény levelét vagy szárát támadják - melyek más trófikus interakciót képviselnek (bio/hemibio/nectrotrof) képesek-e NCR expressziót indukálni. Ehhez a kísérletsorozathoz szintén a stabil transzgénikus *M. truncatula* R108 NCR promóter-GUS riporter vonalakat használtunk.

B. A szimbiotikus sejt differenciáció során végbemenő transzkripció átprogramozás epigenetika szabályzásának vizsgálata, fejlődési stádium (ploideasztint) szerinti, áramlási citométerrel elválasztott sejtmagokban.

5. Ahhoz, hogy bizonyítani tudjuk az összefüggést a szimbiózis-specifikus gének különböző hullámokban történő aktivációja és a differenciálódó szimbiotikus sejtek ploideasztintje között, kiválasztott gének expresszióját mértük 4C, 8C, 16C és 32C sejtmagokban.
6. Mivel a szimbiózis-specifikus gének nagy része az érett szimbiotikus sejtekben (32C) aktív és represszált a nem-fertőzött (4C) sejtekben, genom szinten vizsgáltuk a DNS metiláció (5-mC) változását 4C és 32C sejtmagokban, és vetettük össze publikált *in situ* lézervágott gümözónákból származó RNS szekvenálás adatokkal (Roux et al. 2014). Illetve validálásként kiválasztott gümő-specifikus- és gümő-indukált gének DNS metilációját vizsgáltuk 4C, 8C, 16C és 32C sejtmagokban.
7. Vizsgáltuk genom szinten a kromatin hozzáférhetőségének változását a szimbiotikus sejtek differenciálódása során 4C, 8C, 16C és 32C sejtmagokban. Továbbá, a kromatin változásának mintázatát vetettük össze publikált *in situ* lézervágott gümözónákból származó RNS szekvenálás adatokkal (Roux et al. 2014).
8. Két antagonista hiszton poszt-transzlációs modifikáció - a H3K27me3, mint represszív módosítás illetve a H3K9ac mint aktiváló módosítás - hatását vizsgáltuk kiválasztott, különbözően expresszálo gének esetében 4C, 8C, 16C és 32C ploideasztintú sejtmagokban.

III. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A. NCR gének expresszió analízise

1. Adatelemzés az MtGEA publikus adatbázis használatával és a különböző szövetekben aktív gének specifikálásának kvantifikálása Shannon-féle entrópia számításával.
2. RNS izolálás kézzel-metszett gümözónákból és ezek transzkriptóm analízise (RNA-seq) és összevetése más publikált expressziós adatokkal.
3. Transzgénikus *Medicago* R108 növények előállítása és kiválasztott, különbözően expresszálo NCR gének (*NCR121*, *NCR084*, *NCR001*) aktivitásának vizsgálata β -glükuronidáz riportterrel (GUS) gümő metszeteken.
4. Patogén tesztek elvégzése, a biotikus stressz NCR gének expressziójára kifejtett hatásának vizsgálatára és az NCR122 peptid immunolokalizációja a gümőben.

B. Gümő-specifikus gének ploidiaszint szerinti epigenetikai módosításainak vizsgálata

5. Különböző ploidiaszintű gümő sejtmagok elválasztása sejtszorter segítségével, majd nukleáris RNS izolálása 4C, 8C, 16C, 32C ploidiaszintű sejtmagokból és reverz transzkripciót követően, kiválasztott gének expresszió analízise kvantitatív polymeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével.
6. Genomi DNA izolálás 4C (nem fertőzött gümő sejt) és 32C (szimbiotikus sejt) ploidiaszintű gümő sejtmagokból és genom szintű DNS metiláció vizsgálata biszulfid szekvenálás (RRBS) segítségével.
7. Genomi DNA izolálás 4C, 8C, 16C, 32C ploidiaszintű gümő sejtmagokból és kiválasztott gének DNS metiláció analízise immunoprecipitációval (MeDIP) 5-mC ellenanyaggal.
8. Kromatin izolálás 4C, 8C, 16C, 32C ploidiaszintű gümő sejtmagokból és a kromatin hozzáférhetőség genom szintű vizsgálata ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin sequencing) segítségével.
9. Kromatin izolálás 4C, 8C, 16C, 32C ploidiaszintű gümő sejtmagokból és kiválasztott gének H3K27me₃- és H3K9ac modifikációinak vizsgálata immunoprecipitáció és kvantitatív PCR (ChIP-qPCR) segítségével.

IV. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az MtGEA és más publikus transzkriptóm adatok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a 334, defenzin típusú peptidet kódoló *NCR* gén kizárólag a gyökérgümőben aktiválódik, kivéve 5 *NCR*-t, köztük az *NCR122* gént, melyek nem mutattak szövetspecifitást. Az *NCR* gének expresszió analízise 267 különböző kísérleti körülményt foglalt magába, beleértve 9 növényi szervet, biotikus-, és abiotikus növekedési kondíciókat és különböző fejlődési stádiumokat. Az *NCR* gének többsége kizárólag a gümőben aktív és nem indukálódik más növényi szervekben fitohormonok illetve szárazság- vagy só stressz hatására. Az *NCR* gének nem aktiválódnak Nod faktor kezelés hatására illetve azelőtt, hogy a rhizobiumok bejutnának a gazda sejtbe vagyis mielőtt a szimbiotikus sejtek létre nem jöttek (ezen munka, Nallu et al. 2013; Maunoury et al. 2010). Továbbá, az *NCR*-ek nem vesznek részt a bakteroidok szenescencia során történő degradációjában, mivel expressziójuk a szenescencia korai szakaszában leáll, így a növény nem használhatja az *NCR* peptideket a rhizobiumok megölésére.

Az NCR peptidek homológiát mutatnak antimikrobiális hatással rendelkező defenzinokkal, és számos NCR, főleg a szintetikus kationos peptidek, erős *in vitro* antimikrobiális aktivitással rendelkeznek különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium - köztük humán és növény patogének - valamint gombák ellen (Van de Velde et al. 2010; Tiricz et al. 2013; Ördögh et al. 2014). Ennek ellenére az NCR gének nem aktiválódnak patogén fertőzés hatására, beleértve baktériális-, gomba-, oomycetes- és féreg fertőzést. Továbbá, az NCR-ek nem aktiválódnak fertőzésre érzékeny szervekben sem, mint például levél, mag vagy virág, melyek gyakran termelnek antimikrobiális peptideket (Sels et al. 2008). Ezek alapján úgy tűnik az NCR peptideknek nincs szerepe a növény ún. veleszületett rezisztenciájában („innate immunity”).

A *Medicago* gének szövetspecifitásának kvantifikálása (Shannon-féle entrópia faktor) során az találtuk, hogy az NCR gének, illetve általánosabban a gümő-specifikus gének a leghövszövetspecifikusabb az összes gén közül. Továbbá az NCR-ek ha aktiválódnak expresszió szintjük a legmagasabb az összes gén közül. Összefoglalva az NCR gének csak a gümőben és csak az endoreduplikálódott, poliploid szimbiotikus sejtekben expresszálódnak, ami arra utal, hogy szabályzásuk szigorú transzkripcionális kontroll alatt áll.

2. Az NCR gének a gyökérgümő fejlődése során legalább három hullámban aktiválódnak, melyek megfeleltethetőek térbeli expressziós mintázatuknak. A korai gének a gümő csúcsához közeli II-es zónában (ZII_d, ZII_p) expresszálódnak, míg a késői gének a gümő proximális régiójában az interzóna (IZ) és III-as zónában (ZIII). Továbbá, egyes gének aktiválódásuk után is fenntartják az expressziójukat az idősebb gümősejtekben is, míg más gének expressziója idővel lecsökken. Az általunk végzet kézzel-vágott gümőzónákból származó expressziós adatok egyezést mutatnak az MtGEA-ból valamint a korábban publikált *in situ* RNS szekvenálásból származó NCR gének térbeli expressziójára vonatkozó adatokkal (Roux et al. 2014).

3. Az NCR gének korábban publikált időbeli expressziós mintázatával összhangban a korai *NCR121* gén aktivációja már a fiatal gümőprimordium fázisban megfigyelhető volt 5 nappal fertőzés után, mely fennmaradt az infekciós zónában (ZII) és a nitrogénkötő zónában (ZIII) is. Az *NCR084* gén expressziója 11 nappal fertőzés után volt detektálható a ZII_p, IZ és ZIII-ban. Végül a késői *NCR001* expressziója 11 nappal fertőzés után a ZIII régióban. Mindhárom gén csak a gümőben volt aktív, gyökérben nem, illetve 30 napos gümő szenescens zónájában sem volt detektálható NCR génexpresszió.

4. *NCR* expresszió nem volt kimutatható a biotróf talaj patogén *Phytophthora medicaginis*, a hemibiotróf levél patogén *Colletotrichum trifolii*, és a szürkerothadást okozó nekrotróf *Botrytis cinerea* gomba és *Medicago truncatula* interakciója során. Eredményeiket alátámasztják az MtGEA expressziós adatai is és tovább szélesíti a következtetést miszerint az *NCR*-ek nem vesznek részt a növény patogénekkal szembeni védelmében, legyen az bio-, hemibio-, vagy nekrotróf interakció. Továbbá, herbivória és sokkal általánosabban mechanikai sérülés hatását is vizsgáltuk - ami szintén kiválthat védelmi reakciót a növényből - azonban továbbra sem volt *NCR* expresszió detektálható a levélben.

Az *NCR122* gén atipikus expressziós mintázata a különböző növényi szövetekben illetve a gümő nem-fertőzött sejtjeiben készített minket arra, hogy specifikusa vizsgáljuk az *NCR122* peptid lokalizációját anti-*NCR122* ellenanyaggal. A peptid immunolokalizációja alapján az *NCR122* peptid az érett gümő középső- és a kortikális régióban található nem-fertőzött sejtekben volt lokalizálható.

5. Ahogy korábban bemutattunk, a gümő fejlődése során jelentős génexpressziós változások mennek végbe a differenciálódó sejtekben (Maunoury et al. 2010; Roux et al. 2014; this work). *In situ* transzkript lokalizációs- és promóter-riporter gén fúziós kísérletekkel korábban demonstrálták, hogy a korai gének a fiatal differenciálódó szimbiotikus sejtekben aktívak, míg a késői gének az érett, nitrogénkötő sejtekben aktívak (Mergaert et al. 2003; Maunoury et al. 2010; Van de Velde et al. 2010; Farkas et al. 2014; Roux et al. 2014, ezen munka) ami felveti, hogy expressziójuk specifikus ploidiáshoz kötött. Kiválasztott gümő-indukált és gümő-specifikus gének ploidiáshoz szerinti expresszió vizsgálata során azt találtunk, hogy a korai, első transzkripciós hullámban aktiválódó gének a 4C posztemerisztematikus sejtekben aktívak, míg a második hullám gének, melyek a ZIIId és ZIIp régiókban aktívak a 8C és 16C sejtekben mutatnak expressziót. Végül a késői, harmadik hullám gének, amik expressziója az IZ, ZIII-ban detektálható megfeleltethető a 16C és 32C szimbiotikus sejteknek. Összefoglalva az ismert térbeli expressziós mintázat és az egyes ploidiáshoz szerinti tapasztalt gén aktiváció között pozitív korrelációt találtunk.

6. A *Rhizobium* baktériumok által termelt szignalizációs molekula (Nod faktor) sejt proliferációt indít a gyökér kortikális sejtjeiben, ami a gümő merisztematikus régiójának kialakulásához vezet. A merisztematikus sejtek DNS metilációja a kiindulási-, és valószínűleg a legmetiláltabb állapotot képviseli. Az 5-mC DNS metiláció változását 4C, nem fertőzött sejtekben és érett nitrogénkötő 32C sejtek közt vizsgáltuk. A mC-ok aránya a CG szekvencia kontextusban volt a legmagasabb (75%), majd a CHG (20%) és CHH (5%) kategóriákban

mindkét sejttípus esetében, ami jelzi a CG metiláció fontosságát. DNS metilációs különbséget azonban csak a gümő-specifikus gének kis hányadában detektáltunk, és ezek jelentős részét *NCR* génekben. Az *NCR*-ek több mint felénél detektálható volt a metiláció csökkenése (hypometiláció) a 32C állapotban 4C-hez képest, míg a legtöbb *Medicago* génnél a ploidiaszint nem befolyásolta a DNS metilációt és a független volt a gén aktív vagy represszált állapotától, ami arra utal, hogy a 4C sejtek metilációs mintázata másolódott az ismétlődő endoreduplikációs ciklusok során. A tény, hogy az *NCR* gének eltérően viselkednek az átlag protein kódoló génekhez képest - ahol 375 *NCR*-ből 164 hypometilálódik - egybevágh a nemrég publikált gümő-specifikus MtDME DNS demetiláz gén *IZ* sejtekben mutatott expressziójával, továbbá az *NCR* gének csökkent aktivitásával az MtDME RNS interferencia vonalakban (Satge et al. 2016). A két sejttípusban tapasztalt DNS metilációs különbséghez tehát jelentős mértékben hozzájárulhat az MtDME aktivitása, azonban, hogy egyes *NCR* gének miért esnek át DNS demetiláción míg mások nem, további vizsgálatokat igényel. Az egyik lehetőség, amiért az *NCR* gének demetilálódnak, magyarázható transzpozabilis elemek közelségével (Satge et al. 2016). A növényi genomok gazdagok transzpozonokban, melyeket gyakran a DNS metiláció tart transzkripciósan csendesítve és ez hatással lehet a környező génekre is. Számos transzpozon gén *Medicago*-ban együtt aktiválódik az *NCR*-ekkel noduláció során (Satge et al. 2016), tehát elképzelhető, hogy az *NCR* gének aktivációhoz szükséges van az MtDME általi demetilációra.

7. Az *NCR* gének 44%-a bizonyult hypometiláltnak a 32C szimbiotikus sejtekben a 4C nem fertőzött sejtekhez képest a biszulfid szekvenálás (RRBS) eredményei alapján, melyet MeDIP módszerrel validáltunk. A MeDIP alapján, az 5-mC DNS metiláció csökkenése elsősorban az 1 kb-os promóter régióban eredményezett gén aktivitást. Azonban az *NCR* gének 53%-a nem mutatott DNS metilációs különbséget a két ploidia szint között, ami mutathatja, hogy e gének a 8C és 16C sejtekben aktívak. A kiválasztott gének az RRBS eredményekkel összhangban nem mutattak DNS metiláció csökkenést a négy különböző ploidiaszinten, ami jelentheti, hogy a DNS metiláció nem játszik fontos szerepet szabályzásukban illetve hogy ezen gének kromatin modifikációk által reguláltak.

8. A kromatin struktúra jelentőségét a gének fejlődési állapot- és szövet-specifikus szabályzásában már számos közleményben bizonyították mind növények mind állatok esetében. Kimutattuk, hogy a kromatin „nyílása” és „záródása” pozitív korrelációt mutat a gének aktív és represszált állapota között különböző ploidiaszintű sejtmagokban. Azonban az is megfigyelhető volt, hogy a kromatin nyitott állapota nem elégséges a gén aktív transzkripciójához és habár a kromatin hozzáférhetőség kis eltéréseket mutatott az egyes

ploidiaszintek között a legnyitottabb kromatin konformáció a 32C érett, szimbiotikus sejtekben volt tapasztalható. A kromatin struktúra átrendeződése főként a transzlációs start hely közelében volt jelentős. A korai gének esetében a kromatin hozzáférhetősége a 4C és 8C sejtekben volt a legmagasabb, míg a késői gének esetében 16C és 32C sejtekben. Továbbá, nem találtunk szoros összefüggést a kromatin hozzáférhetősége és a DNS metilációval jelenléte illetve mértéke között, tehát annak ellenére is kinyílt a kromatin, hogy a jelentős mértékű DNA metiláció nem változott a különböző ploidiaszintű sejtekben.

9. Vizsgáltuk a represszív H3K27me₃ és az aktiváló H3K9ac hiszton fehérje modifikációk változását mind a négy ploidiaszinten, kiválasztott szimbiózis-specifikus gének esetében, melyek térben és időben különböző expressziós mintázatot mutatnak. A H3K27me₃ módosítás túlnyomó részt a 4C sejtekben volt detektálható és vélhetően fontos szerepet játszik az *NCR*-ek és más szimbiózis-specifikus, késői gén repressziójában a szimbiózis kezdeti szakaszában. A korai gének esetében a H3K27me₃ modifikáció szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető a 8C és 16C állapotokban, ahol ezen gének expressziója detektálható, míg 32C sejtekben a modifikáció szintje megemelkedett, és ezzel egyidejűleg a korai gének inaktiválódtak az érett szimbiotikus sejtekben. Ellenben a késői géneknél a csökkent H3K27me₃ modifikáció és a H3K9ac szint emelkedése 32C sejtekben génaktivitást eredményezett. Összefoglalva, az *NCR* gének a szimbiotikus sejtekben jelentős mértékben expresszálnak, amihez hozzájárul a H3K27me₃ módosítás csökkenése, az aktiváló H3K9 acetiláció szintjének emelkedése a gén promóter- és kódoló régiójában, valamint a nyitott kromatin struktúra.

A szimbiózis specifikus gének ploidiaszint szerinti DNS metiláció, represszív H3K27me₃ és az aktiváló H3K9ac hiszton modifikációk és a kromatin hozzáférhetőségének vizsgálatai hozzájárultak, hogy először képet kapjunk a szimbiotikus sejt differenciálódás során zajló több szintű epigenetikai szabályzásról. Továbbá munkánk egy lépéssel előrébb visz az *NCR* gének rendkívül szigorú szabályzásának megértése felé.

V. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz kapcsolódó közlemények jegyzéke

Guefrachi I*, Nagymihály M*, Pislariu C*, Ratet P, Mars M, Udvardi M, Kondorosi E, Peter Mergaert P, Alunni B. (2014) Extreme specificity of *NCR* gene expression in *Medicago truncatula*. BMC Genomics 2014, 15:712.

*Equal contribution

Nagymihály M, Veluchamy A, Györgypál Z, Ariel F, Jégu T, Benhamed M, Szűcs A, Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi É. (2017) Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. PNAS, 114(17):4543-4548.

Összesített impact faktor: 13,409

A dolgozathoz nem kapcsolódó egyéb közlemények jegyzéke

Nagymihály M, Vásárhelyi B. M, Barriere Q, Chong T-M, Bálint B, Bihari P, Hong K-W, Horváth B, Ibijbijen J, Amar M, Farkas A, Kondorosi É, Chan K-G, Gruber V, Ratet P, Mergaert P, Kereszt A. (2017) Genome sequence of *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* strain CCMM B554 (FSM-MA), a highly effective nitrogen-fixing microsymbiont of *Medicago truncatula*. Submitted to Standards in Genomic Sciences.

Kazmierczak T*, Nagymihály M*, Lamouche F, Barrière Q, Guefrachi I, Alunni B, Ouadghiri M, Ibijbijen J, Kondorosi É, Mergaert P, Gruber V. (2017) Specific Host-Responsive Associations Between *Medicago truncatula* Accessions and *Sinorhizobium* Strains. Mol Plant Microbe Interact. 30(5):399-409.

*Equal contribution

Nagymihály M, Attila Szűcs A, Attila Kereszt A. (2015) Next-Generation Sequencing and its new possibilities in medicine. Acta Biol Szeged 59(Suppl.2):323-339.

Hunyadkúrti J, Feltóti Z, Horváth B, Nagymihály M, Vörös A, McDowell A, Patrick S, Urbán E, Nagy I. (2011) Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* type IB strain 6609. J Bacteriol. 193(17):4561-2.

Összesített impact faktor: 8,645

Konferencia részvétel:

Előadás

Nagymihály M, Szűcs A, Ariel F, Jégu T, Benhamed M, Kereszt A, Mergaert P and Kondorosi É. (2016) Dynamic changes in chromatin structure regulate expression of nodule-specific *NCR* genes in *Medicago truncatula*. Straub days BRC, Szeged, p. 4.

Nagymihály M, Szűcs A, Ariel F, Jégu T, Benhamed M, Kereszt A, Mergaert P and Kondorosi É. (2016) Dynamic changes in chromatin structure regulate expression of nodule-specific *NCR* genes in *Medicago truncatula*. 12th European Nitrogen Fixation Conference, Budapest, p. 119.

Poszter előadás

Nagymihály M, Guefrachi I, Pislariu C, Van de Velde W, Ratet P, Mars M, Udvardi M. K, Kondorosi É, Mergaert P, Alunni B. (2014) Extreme specificity of *NCR* gene expression in *Medicago truncatula*. 11^{èmes} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, France, p. 106.

Nagymihály M, Jégu T, Szűcs A, Benhamed M, Kereszt A, Mergaert P and Kondorosi É. (2015) Endoreduplication- and chromatin mediated regulation of gene expression in symbiotic nodule cells of *Medicago truncatula*. 23rd North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Ixtapa, Mexico, p. 63.

Jesus Caballero Award a legjobb poszter előadásért.

Nagymihály M, Veluchamy A, Györgypál Z, Ariel F, Jégu T, Benhamed M, Szűcs A, Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi É. (2017) Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of *NCR* gene expression. Frontiers in Beneficial Plant-Microbe Interactions, 3rd Adam Kondorosi Symposium, Gif-sur Yvette, France