

B 3879

Ph.D. értekezés tézisei

Gümős-specifikus glicin-gazdag fehérjék vizsgálata *Medicago* fajokban

Készítette: Kevei Zoltán



Témavezetők:

Dr. Kiss György Botond

Genetika Intézet

MTA Szegedi Biológiai Központ

Dr. Kondorosi Éva

Dr. Kondorosi Ádám

Institut des Sciences du Végétal

Centre National de la Recherche Scientifique

2002

Bevezetés

A glicin-gazdag fehérjék (GRP) molekuláris felépítése számos eltérést mutat a növényvilágban. Legtöbbjük a kvázi-repetitív GGGX, GGXXXGG vagy GXGX ismétlődést tartalmazza, melyek eltérő méretű fehérjéket alkotnak. Az amino-terminális szignálpeptid ugyancsak jellemző, de egyéb motívumok is megtalálhatóak (hideg-sokk domén, cisztein-gazdag mintázat, RNS-kötő motívum). A sejten belüli lokalizáció eltérései és a különböző expressziós mintázatok arra utalnak, hogy számos fiziológiai folyamatban működhetnek közre.

A legtöbb GRP biotikus (virális vagy gomba fertőzés, nematoda támadás, cirkadián ritmus) és abiotikus (szalicil-sav, abszciszin-sav, metil-jázmonsav, etilén, ozmotikus stressz, hideg-sokk, sérülés, fény) szabályozás alatt áll. A sejten belül a legtöbb GRP a sejtfalhoz vagy a sejtmembránhoz kötötten található, habár a nukleuszban és a citoplazmában is kimutatták jelenlétüket. A szerv és szövetspecifikus vizsgálatok rámutattak, hogy a GRP-k főleg a protoxylem, a xylem, a phloem és az epidermisz szöveteiben fejeződnek ki, de néhány GRP-t izoláltak virágból illetve gyümölcsből.

Számos, erősen kifejeződő GRP-t sejtfalalkotó szereppel ruháztak fel, ami a sejten belüli elhelyezkedést tükrözi a prolin-gazdag illetve hidroxiprolin-gazdag fehérjékhez hasonlóan. A különböző tanulmányok viszont arra utalnak, hogy a GRP-k sokkal szélesebb szerepkört tölthetnek be a növényfejlődés során. Valószínűnek tartják a sejtek lignifikálásában való részvételüket, sejtmembrán-citoszkeleton illetve sejtmembrán-sejtfal közötti kapcsolatok kialakításában végzett feladataikat. RNS-kötő motívummal rendelkező GRP-k az RNS érése és a gén szabályozására lehetnek hatással. Mégis az egyetlen „valódi” GRP funkcióról az *Arabidopsis thaliana* AtGRP3 esetében beszélhetünk, mely az úgynevezett WAK1 (sejtfal-kötött receptor kináz) szignáltranszdukciós mechanizmusában vesz részt, ahol a WAK1 fehérjéhez kapcsolódva aktiválja annak, a KAPP (kináz-kötött foszfatáz) fehérjére kifejtett hatását.

Néhány glicin-gazdag fehérjét izoláltak *Vicia faba* szimbiotikus együttéléséből származó nitrogénkötő gümödből is. Ez az egyedi növényi szerv a pillangósvirágú növényeken, nitrogénszegény környezetben, a *Rhizobium* baktériummal létrehozott szimbiózis során fejlődik ki, mely folyamat során speciális gének aktiválódnak és termelnek olyan fehérjéket (nodulinok), melyek a gümöfejlődés különböző szakaszaiban fejtik ki hatásukat. Az időbeli megoszlás alapján a nodulinokat két nagy csoportra osztjuk, a korai (*enod*) és késői (*nod*) nodulinokra. A *Vicia*-ból izolált GRP-k (*Vfnod-GRP1*, *Vfenod-GRP2*, *Vfnod-GRP3*, *Vfnod-GRP4* és *Vfenod-GRP5*) kizárólagos gümöspecifikus expressziót mutattak, főleg a II-III-as interzónában illetve a III-as zónában fejeződtek ki. Gümöspecifikus cDNS könyvtárak szisztematikus tesztelése és szekvenálása során mind *M. sativa*-ban, mind *M. truncatula*-ban megtalálták a *Vfenod-GRP5* homológját.

Ph.D. munkám során megpróbáltunk információt nyerni arról, hogy a lucernából izolált *GRP* gének milyen módon befolyásolják a gümőfejlődést. Kíváncsiak voltunk, vajon ezek a *GRP* gének valóban gümőspecifikusak-e, milyen jelátvitel szükséges a gének aktivációjához, a gümőfejlődés mely szakaszaiban működhetnek közre, illetve a gümő mely zónáiban fejeződnek ki. Ugyanakkor a gének genomi szekvenciájának felépítését, a genetikai térképen elfoglalt pozíciójukat is vizsgáltuk és végül megpróbáltuk megfejtetni a gümözésben betöltött szerepüket.

Alkalmazott módszerek

Munkánk során különböző molekuláris módszereket alkalmaztunk. Ezek közé tartozott a Southern-analízis, a Northern-analízis, az RT-PCR, az *in situ* hibridizáció, a DNS-klónozás, a transzformáció és a DNS-szekvenálás technikája.

Ezeket a módszereket alkalmaztuk a DNS-könyvtárak tesztelésénél, az RNS és DNS izolálásánál, a bakteriális és növényi transzformációkhoz szükséges DNS-ek klónozásához, a genetikai térképezéshez, illetve az RNS-expressziók vizsgálatához a különböző növényi szövetekben.

Eredmények

A glicin-gazdag fehérjék izolálásához egy *Medicago sativa ssp. varia* A2-es növény gümőspecifikus cDNS könyvtárt teszteltük a *V. faba* cDNS-klónokkal. Ennek eredményeként 37 cDNS-t találtunk, amelyek 4 különböző *GRP* génhez tartoztak. *MsnodGRP1*-hez 11 cDNS tartozott és csak alacsony homológiát mutatott *Vfnod-GRP1*-hez. A *Vfnod-GRP4* próbával 16 klónt kaptunk melyek két, nagyon homológ cDNS-t határoztak meg, *MsnodGRP2A*-t és *MsnodGRP2B*-t. *MsnodGRP3*-hoz 10 klón tartozott, melyek 72%-os azonosságot mutattak *Vfnod-GRP5*-hez.

Az *MsnodGRP1*, *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* cDNS-ek parciális klónoknak bizonyultak. A *M. truncatula* EST adatbázisok segítségével azonban meghatároztuk a teljes szekvenciájukat. Mindegyik cDNS kisméretű putatív fehérjét kódolt. *MsnodGRP1* 112, *MsnodGRP2A* 101, *MsnodGRP2B* 114, *MsnodGRP3* pedig 217 aminosavból állt. Mindegyikük hidrofób aminoterminális szignálpeptid szekvenciával rendelkezett. *MsnodGRP1*-ben, *MsnodGRP2A*-ban és *MsnodGRP2B*-ben nem voltak jelen a jellegzetes glicin-gazdag ismétlődő szakaszok, velük ellentétben *MsnodGRP3* 42, 40, 42, 42 aminosavakból álló repetitív szakaszokkal rendelkezett, melyek egy konzerválódott WRDWGGSFW oligopetidet tartalmaztak. A *GRP3* molekuláris felépítése nagy hasonlóságot mutatott a lucerna NMs22 és a *Vicia Vfnod-GRP5* fehérje szerkezetéhez. A *GRP3* négy ismétlődő doménjével szemben, az NMs22 három domént

tartalmazott a WRDWGG oligopeptid motívummal, míg a Vfnod-GRP5 fehérje mindössze két doménje szintén a WRDWGGSFW oligopeptid mintázattal rendelkezett. Az MsnodGRP2A és MsnodGRP2B fehérjék hasonlósága a Vfnod-GRP4-hez kisebb mértékűnek bizonyult, míg egymással 85%-os hasonlóságot és 80%-os azonosságot mutattak. Az MtnodGRP2A és MtnodGRP2B proteinek szignálpeptidjei szignifikáns homológiát mutattak az Mtn29, illetve néhány, a *M. truncatula* EST adatbankokban található szekvenciákról (TC40868, TC41363, TC35313) meghatározott fehérjék szignálpeptidjéhez. Ezek a fehérjék is N-terminális szignálpeptiddel valamint az átlagnál magasabb glicin-tartalommal rendelkeztek. A *M. truncatula* gümöspecifikus cDNS-könyvtár *MsnodGRP1*-gyel való tetsztelése során három variánsra bukkantunk: *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B* és *MtnodGRP1C*. A róluk átíródó fehérjék nagy mértékben hasonlóak voltak az *MsnodGRP1*-hez az N-terminális szignálpeptid részen és a C-terminális régióban, de a középső régiók kevésbé konzerválódtak.

A *GRP* gének expressziós vizsgálatához Northern-analízist alkalmaztunk, melyhez RNS-t izoláltunk virágból, gyökérből, hipokotilból, levélből, szárból, gümöből (fiatal, érett, spontán). Egyik *MsnodGRP* gén sem fejeződött ki virágban, levélben, szárbán, hipokotilban, gyökérben vagy spontán gümőben, viszont mindegyik *GRP* expresszált a *S. meliloti* által indukált gümőkben. *MsnodGRP1*, *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* gének főleg a fiatalabb gümőkben fejeződtek ki, míg az *MsnodGRP3* transzkripció aktivitása nőtt a gümőfejlődés során. A Northern-analízis megmutatta, hogy a *GRP* gének valódi nodulin-gének. Két mutáns *S. meliloti* törzs segítségével az *MsnodGRP* gének indukcióját vizsgáltuk. Az AK1492 vonal nem képes vad típusú exopoliszaharidot (EPS), illetve kapszuláris poliszaharidot termelni, így nem képes a gümők inváziójára (ExoKps⁺Inf⁻ mutáns), míg a 8368-as törzs nem képes bakteroiddá differenciálódni (Bac⁻). Az AK1492 baktérium által indukált gümőkben mindegyik *MsnodGRP* gén csökkent kifejeződést mutatott, míg a Bac⁻gümőkben a *GRP* gének működése nem változott. Az eredmények azt mutatták, hogy az *MsnodGRP* gének indukcióját bakteriális poliszaharid kontrolálja és/vagy *Rhizobium*-invázió szükséges a gének kifejeződéséhez. Számos *GRP* gén esetében kimutatták, hogy különböző kémiai, fizikai és biológiai faktorok hatására megváltozhat expressziójuk. Naftil-ecetsavval, abszcizinsavval, gibberelinsavval és kinetinnel, illetve stressz-körülmények között, hőszökkel, hidegsökkel, hipoxiával és szárítással kezelt lucerna gyökerekben nem változott az *MsnodGRP* gének kifejeződése. Az *MsnodGRP2A*-hoz és *MsnodGRP2B*-hez hasonló *M. truncatula* gének expresszióját is vizsgáltuk, ami megmutatta, hogy egyik gén sem expresszált gyökérben, míg mindegyik indukálódik a gümőfejlődés során, habár eltérő módon.

A *GRP* gének gümőfejlődés során kifejtett indukciójának részletesebb mechanizmusát RT-PCR kísérletekkel vizsgáltuk, melyhez 0-3 napos gyökérből, 4-5 napos gümő-primordiumból, 7-10 napos fiatal gümöből és 15-28 napos érett gümöből származó RNS-ekből cDNS-t szintetizáltunk. A

gyökérben detektált gyenge háttérrel mellett az *MsnodGRP1* mRNS szintje 4 napos gümőben nagy mértékben megnövekedett, 5 napos gümőben elérte a maximumát, majd a gümőfejlődés további szakaszaiban is magasabb szinten maradt. Az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* esetében nem volt expresszió a gyökérben, a gének indukciója az 5 napos gümőben kezdődött, a 7 napos gümőben elérte maximumát, a gümő-organogenezis további szakaszaiban pedig erőteljesen lecsökkent. Az *MsnodGRP3* génje csak a 7 napos gümőben indukálódott, viszont aktív maradt a gümőfejlődés későbbi, ténylegesen nitrogénfixáló szakaszaiban is. A gümőfejlődés kontrolljaként egy korai nodulin gén, az *Msenod40* expresszióját is vizsgáltuk. Az expressziós kinetika különbségei arra utalnak, az *MsnodGRP*-k valószínűleg az gümőfejlődés egymást követő szakaszaiban játszhatnak szerepet.

Ahhoz, hogy meghatározhatjuk a *GRP* gének térbeli kifejeződését a gümőkben szensz és antiszensz *MsnodGRP*-RNS-próbákkal *in situ* hibridizációt végeztünk. Az *MsnodGRP1* transzkriptumát a gümőcsúcsban, a II-es zónában detektáltuk, míg a nitrogénkötő, III-as zónában nem volt jelen. Az *MsnodGRP2* gének kizárólag a II-III-as interzónában fejeződtek ki, azon belül is főleg egy sejtrétegben. Az *MsnodGRP3* a gümőcsúcsban nem expresszált, főként a nitrogénkötő sejtekben fejeződött ki, néhány esetben azonban a hibridizációs jel erősebb volt a korai szimbiotikus zónában, mint a késői III-as zóna sejtekben. A szensz RNS-próbák negatív eredményei és az eltérő expressziós mintázatok bizonyították, hogy a különböző hibridizációs jelek specifikusak mindegyik *MsnodGRP*-re.

Mindegyik *MsnodGRP* gén helyzetét meghatároztuk a *M. sativa* genetikai térképén RFLP módszerrel. Az *MsnodGRP1* génje az 5-ös kapcsoltsági csoportban található, míg az *MsnodGRP2A*, *MsnodGRP2B* és *MsnodGRP3* gének a 2-es kapcsoltsági csoportba térképeződtek. Bár az *MsnodGRP2* gének és az *MsnodGRP3* gén ugyanabban a kapcsoltsági csoportban található, egymástól nagy fizikai és genetikai távolságban helyezkednek el.

Az *MsnodGRP* géneket tartalmazó *M. truncatula* genomi klónokat (BAC-klónok) vizsgáltuk, hogy megfelejtsük a gének molekuláris szerkezetét. Az *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C*, *MtnodGRP2A*, *MtnodGRP2B* és *MtnodGRP3* génekhez tartozó BAC-klónokat izoláltuk. A legtöbb gén két vagy három exonnal rendelkezett, kivéve *MtnodGRP3*-t, mely a repetitív szerkezetét tükröző 4 exont tartalmazta. Mindegyik *MtnodGRP* első exonja szinte kizárólag a szignálpeptidet meghatározó szekvenciát hordozta. A promóterként prediktálható DNS-szakaszok legalább 90%-ban azonosnak bizonyultak a három *MtnodGRP1* gén, illetve a két *MtnodGRP2* gén összehasonlításában, ami az általuk kódolt nodGRP-k hasonló szabályozást sejteti.

Antiszensz transzformáció segítségével próbáltuk vizsgálni az abundánsan kifejeződő *MsnodGRP*-k gümözésben betöltött szerepét. Az *MsnodGRP1* és *MsnodGRP2A* cDNS-eket antiszensz orientációban klónoztuk bináris növényi vektorokba, amiket *Agrobacterium tumefaciens*

segítségével *M. truncatula* R-108-as növényekbe transzfornáltunk. Mind az *MsnodGRP1*, mind az *MsnodGRP2A* esetében hat független vonalat találtunk, melyekből kettő, az *MsnodGRP2*-t magasan expresszáló vonalat választottunk ki további analizisre. A T1 generációk nagy része normális gümőfejlődést mutatott, kivéve három egyedet, melyek az *MsnodGRP2/15*-ös T0 vonalból származtak és legerősebben expresszálták az *MsnodGRP2A* antiszensz-cDNS-t. Ezekben a növényekben a gümőfejlődés valószínűleg a nirtogéncikló sejt differenciálódásánál leállt, a gümők a gömbszerű formában maradtak, sőtét színük pedig a szenszencziára, elhalásra utalt. Ezekből a növényekből származó T2 generációkat is teszteltük a gümőképzés folyamatára, azonban nem találtunk közöttük Fix fenotípust hordozó egyedeket, így az újabb generáció segítségével nem tudtuk bizonyítani, hogy az antiszensz-expresszió összefüggésbe hozható gümőzés folyamatában bekövetkezett változással.

Az eredmények megvitatása

A dolgozatban a *M. sativa* és a *M. truncatula* növények gümőiből származó, különböző, glicinben gazdag fehérjéket kódoló cDNS-ek izolálását és jellemzését mutattuk be. Ezek a fehérjék szekréciós, sejtmembrán-transzportot irányító szignálpeptidet és glicingazdag domént tartalmaznak, habár a glicintartalom alacsonyabbnak bizonyult (20-30%-os), mint az egyéb GRP-k esetében, ahol ez az érték meghaladhatja a 80%-ot. Továbbá ezek a nodulin-gének kizárólag gümőspecifikus aktivitást mutatnak, így a GRP gének széles családján belül is egy újabb alcsaládot határoznak meg.

Mindegyik vizsgált gümőspecifikus GRP-ből hiányoznak a tipikus glicingazdag repetitív motívumok, csak néhány GGX szekvenciából álló ismétlődés található bennük. Az *MsnodGRP3* fehérje az egyetlen, amelynek szerkezete nagyobb ismétlődésekből áll, azon belül is egy WRDWGGSFW mintázattal. *MsnodGRP3* szignálpeptidje szignifikáns homológiát mutat a *Trifolium repens*-ből izolált DD17-es nodulinnal, amelyik fehérje ugyancsak számos glicint tartalmaz a karboxiterminális régiójában.

A megfelelő *M. truncatula* genomikus klónok izolálásával bebizonyítottuk, hogy a nagyon hasonló *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* proteinek két különböző génnek a termékei. Szignálpeptidjeik magas homológiát mutatnak három, *M. truncatula* EST-k (TC40868, TC41363, TC35313) által kódolt proteinekhez, illetve az MtN29-hez. A szignálpeptid-homológok közé sorolható a borsóban (*Pisum sativum*) korai-nodulinként leírt Enod7, viszont ennek a fehérjének a glicintartalma meglehetősen alacsony.

MsnodGRP1 génnek 3 homológját izoláltuk *M. truncatula*-ból (*MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C*), melyek közül egyik sem bizonyult igazi ortológ párnak, a homológ

részeket a fehérjék szignálpeptid és a karboxiterminális glicingazdag régiója képezi, míg a centrális régiók kevésbé konzerváltak.

A különböző *nodGRP* gének genomi szekvenciájának vizsgálata megmutatta, hogy néhány hasonlóság a géneik molekuláris szerveződésére is jellemző. Mindegyik *nodGRP* gén első exonját főleg a szignálpeptid szekvenciája alkotja, míg az utolsó exon a glicingazdag domént foglalja magába, kivéve az *MtnodGRP3*-at kódoló gént, mely exonjainak szerkezete a repetíciókat követi. A különböző *MsnodGRP* gének egymástól nagy fizikai és genetikai távolságban helyezkednek el a lucerna kapcsoltsági csoportjaiban, vagyis ha a géneik eredete valaha közös is volt, korán szétválhatott fejlődésük.

A GRP nodulinok kapcsolatát filogenetikai törzsfá segítségével analizáltuk. Ahogy az várható, az *MsnodGRP1* és a közeli rokon fehérjék, az *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B* és *MtnodGRP1C* alkotnak egy csoportot. Érdekes módon azon fehérjék, melyek szignálpeptidjei az *Ms/MtnodGRP2*-éhez hasonlítanak a filogenetikai fa távolabbi ágán helyezkednek el. A TC35313 protein inkább a *nodGRP1* fehérjékkel mutat rokonságot, míg a TC40868 és TC41363 fehérjék az *Ms/MtnodGRP3*-at tartalmazó csoporthoz kapcsolódnak. Ugyanebben a csoportban van az *NMs22/NMt22*, a *Vfenod-GRP5*, a *DD17* és a *Vfenod-GRP3* fehérje is. Az *Ms/MtnodGRP2* fehérjékhez kapcsolódik a *Vfnod-GRP4*, míg a nagyon hasonló szignálpeptidet tartalmazó *MtN29* eredete távolabbinak tűnik. Számításba véve, hogy ezek a *nodGRP*-k nem mutattak homológiát az egyéb GRP-khez, ezek a fehérjék nemcsak a GRP-knek képezik egy új alszaládját, hanem a nodulinok egy újabb csoportját is meghatározzák.

Mindegyik *Medicago nodGRP* expressziója gümőspezifikus, mely bakteriális fertőzést is igényel, habár a transzkripció aktivitásuk eltérő képet mutat a gümőfejlődés során. Az *MsnodGRP1* génje, a 4. napon, 2 nappal az *Msenod40* után kezd expresszálni, ekkor a gümő-primordium merisztémára és inváziós zónára differenciálódik, mely inváziós zónában a baktérium megfertőzi a növényi sejteket. Az *in situ* hibridizációs kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az *MsnodGRP1* transzkriptumok a II-es zóna teljes hosszán találhatóak, míg a III-as zónából hiányoznak. Ez a mintázat jól tükrözi az expressziós kinetikát, *MsnodGRP1*-nek valószínűleg a szimbiotikus szövetek differenciációjában lehet szerepe.

MsnodGRP2A és *MsnodGRP2B* transzkriptumait nem lehet megkülönböztetni Northern hibridizációval, ezzel szemben az RT-PCR kísérletekben mindkettőhöz speciális oligonukleotid primereket tudunk használni, így bizonyítottuk, hogy mindkét gén a gümőfejlődés 5. napján lép működésbe. Az 5. naptól a 7. napig a II-es zóna disztális sejtei szimbiotikus, nitrogénköltő sejtekké alakulnak, ezalatt az idő alatt az *MsnodGRP2* transzkriptumok mennyisége az 5-szörösére növekszik. Az *in situ* hibridizációs kísérletek a II-III-as interzónát jelölték meg, ezen belül is igazán csak néhány, 2 vagy 3 sejtréteg az amelyik expresszálja az *MsnodGRP2* géneket. Ezekben a

sejtekben valószínűleg a legfontosabb és legdrasztikusabb molekuláris változások történnek, melyek a szimbiotikus, nitrogénkötő sejtek végső kialakulásához vezetnek. Az Ms/MtnodGRP2-k különböző szignálpeptid-homológiai ugyancsak gümöspecifikus fehérjék.

Az *MsnodGRP3* génje a 7. napon indukálódik, de aktivitása megmarad a gümő aktív nitrogénfixáló szakaszában is. Az *in situ* hibridizáció az *MsnodGRP3* transzkriptumokat a III-as, nitrogénkötő zónában jelölte meg, ami egyezést mutat az *MsnodGRP1*-hez és az *MsnodGRP2A/B*-hez képest késleltetett indukcióval, illetve a magasabb transzkriptum-szinttel az aktív nitrogénfixáló periódusban.

A *S. meliloti* mutánsok segítségével bizonyítottuk, hogy a *nodGRP* gének expressziója függ a bakteriális fertőzéstől, de független a bakteroid differenciációtól. Mivel a gének kifejeződése speciális zónákban illetve sejtrétegekben érvényesül, felmerül annak a lehetősége, hogy a *nodGRP*-k - az *AtGRP3*-hoz hasonlóan - a molekuláris szignálátviteli folyamatokban vesznek részt. Amikor a gümőfejlődés során a baktériumok behatolnak a gazdasejtbe, a *nodGRP1* és *nodGRP2* fehérjék mintegy jelzésként szolgálhatnak specifikus molekuláris struktúrák (mint pl. peribakteroid membrán) kialakításához. A *nodGRP1* és *nodGRP2* fehérjékkel ellentétben a *nodGRP3* szerepe inkább a szimbiózis kialakulásának későbbi lépéseiben lehet, amikor már a nitrogénkötés folyamata megkezdődött. A *nodGRP*-k molekuláris folyamatokban betöltött, baktériumok által indukált jelközvetítői szerepének lehetősége egybevág azzal a ténnyel is, hogy kizárólagos gümöspecifikus expressziójuk mellett, az egyéb biotikus és abiotikus, a más *GRP*-kre ható regulátorok nem befolyásolják működésüket.

A *nodGRP*-k valódi funkciójának kiderítéséhez valószínűleg „knock out” *M. truncatula* mutánsok analízise lenne a legmegfelelőbb módszer, de az ilyen típusú mutáns-bankok készítése még folyamatban van. Ezért a géncsendesítés (gene silencing) másik lehetséges megoldásként antiszensz növények előállításával kísérleteztünk, de ezek analízise még nem hozott végleges eredményt. A további tervekhez kapcsolódik még a *nodGRP* fehérjékkel esetlegesen kölcsönható partner kutatása élesztő kettős hibrid technika segítségével. A genomi szekvenciák izolálásával lehetőség nyílt a gümöspecifikus promóterek részletesebb vizsgálatára, melyek segítenék megérteni a gümőképzés során indukált gének működésének molekuláris mechanizmusát az indeterminált gümőt kialakító pillangósvirágú növényekben.

A dolgozat készítéséhez felhasznált tudományos publikáció

Kevei, Z., Vinardell, J.M., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2002) Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* ssp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:922-931

A dolgozat készítésekor NEM használt tudományos publikációk

Cerbah, M., Kevei, Z., Silijak-Yakovlev, S., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Trinh, T.H. (1999) FISH chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* lines Jemalong J5 and R108-1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 947-950.

Endre, G., Kaló, P., Kevei, Z., Kiss, P., Mihacea, S., Szakál, B., Kereszt, A., Kiss, G.B. (2002) Genetic mapping of the non-nodulation phenotype of the mutant MN-1008 in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Mol. Genet. Genomics* 266:1012-1019.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., Kiss, G.B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962-966.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Szeged, 2003. március 19.

Dr Kiss György Botond

