

Szakmai zárójelentés**1. Strukturális genomika****1. 1. Az RPS13 gén szekvenciájához homológ régió deléciója *M. sativa*-ban**

A diploid lucerna (*Medicago sativa*) genetikai térképének megszerkesztése során csoportunk azonosította a szegregáló populáció F2 egyedei között egyet (a 100-as jelű egyed, lásd 1. ábra), mely az RPS13 (ribosomal protein S13) fehérjét kódoló gén egyik lókuszára nézve (L408BD) deléciót szenvedett, ugyanakkor nem mutatott morfológiai, fenotipikus elváltozást a vad típusú egyedekhez képest, amely az L408BD lokuszhoz mutatott szoros kapcsoltságot. Az L408 jelű cDNS próbával - melyet Györgyey Jánostól (SzBK, Szeged) kaptunk - végzett hibridizációkban az RFLP polimorfizmusok alapján az *RPS13* gén két térképhelyét azonosítottuk a lucerna genomjában (LG2, LG4), a deléció az egyik kapcsoltsági csoporton (LG2) lévő lókuszt érintette (1. ábra).

Annak vizsgálatára, hogy a deléció a *M. sativa* genom mekkora szakaszát és azon milyen egyéb géneket érintett, a közeli rokon pillangósvirágú modellnövény, a *Medicago truncatula* A17-es vonalára vonatkozó, az adatbankokban elérhető szekvencia információkat, valamint a Mt A17-es növény össz DNS-éből készült két BAC könyvtárat vizsgáltuk először.

A TIGR adatbázis alapján a *M. truncatula* esetében három átíródó *RPS13* gént reprezentáló szekvencia van EST contig (TC) formájában, ezek a következők: TC43477 , TC45398 , TC53731 . Az L408 jelű lucerna DNS klón szekvenciájával a TC43477 mutatja a legnagyobb fokú homológiát (98% nukleotid azonosság), míg a másik két TC-vel távolabbi a rokonság (81%, ill. 78%). A L408-as cDNS klónban lévő inszertet csoportunk szekvenálta és deponálta a GeneBank-be (Kaló et al., GeneBank, azonosító szám AJ410087). A szekvenciák illesztése a 2. ábrán látható. Táblázatos formában a szekvencia homológiákat DNS és aminosav szinten az 1. táblázatban tüntettük fel.

Génspecifikus PCR-rel mind a három TC-nek megfelelő *M. truncatula* *RPS13* gént tudtuk amplifikálni, és szekvenálással bizonyítottuk, hogy az általunk azonosított mth2-BAC klónok (melyeket multiplex módszerrel azonosítottunk) valóban hordozzák a három különböző *RPS13* szekvenciát. Mindegyik amplifikált génfragmentet külön hibridizációs

próbaként használva térképeztük újra az *RPS13* géneket. A vártak megfelelően a TC43477 -vel jellemzett gén lucernában az L408-nak megfelelő két lókuszt azonosította az LG2 és LG4 kapcsoltsági csoportokon (a genotipizálás alapját képező autoradiogramot a 3. ábra mutatja), míg ugyanez a próba tisztán csak egy lókuszt, az LG4-en lévő jelölte meg a hibridizációval a *M. truncatula* növényen ((a genotipizálás alapját képező autoradiogramot a 4. ábra mutatja)). A másik két TC közül a TC53731 -tal jellemzett gén az LG5, míg a TC45398 az LG8 kapcsoltsági csoporton jelölt egy-egy lókuszt (eredmények nincsenek feltüntetve). E két próba egyike sem mutatta kereszthibridizáció jeleit az "eredeti", L408, ill. szekvenciákkal kapott RFLP lókuszeknek megfelelő hibridizációs jelekkel. Ezekből a kísérletekből egyértelműnek látszott, hogy bár a lucernában két lókuszt azonosítható az L408 próbával, addig *M. truncatula* növényben ennek csak egy egyedi lókuszt megfelelője található, és pontosan az hiányzik az LG2 csoporton, amelyet vizsgálni akartunk a *M. truncatula* segítségével a lucernában.

Egyértelműen igazoltuk tehát, hogy a lucernában két lókusztban (LG2 és LG4) jelen lévő *RPS13* géneknek *M. truncatula* növényben csak egy megfelelője van, az LG4 kapcsoltsági csoporton lévő lókusztban. Mivel e modellnövényben éppen az a lókuszt hiányzik, amelyikre a lucernában a delécióból kifolyólag kíváncsiak vagyunk, ezért jelen esetben a *M. truncatula* növény nem volt segítségünkre..

Kísérleteink két irányban haladtak tovább: egyrészt a *M. truncatula* és lucerna növényekben e régiók közti különbség feltérképezésére a *M. truncatula* LG4 kapcsoltsági csoporton az *RPS13* gén melletti szekvenciák segítségével megnéztük, hogy vajon érintett-e másik géneket is a génduplikáció az *RPS13* gén szomszédságában, és ha igen, vajon szintén csak a lucernában történt mindez, vagy ezen másik gének a *M. truncatula* növényben is duplikálódtak-e. Ehhez a *M. truncatula* LG4-re térképeződő MtH2-6B12 és MtH2-20A12 BAC klónokból összeállított kontigon 1-1 kódoló szekvenciára primereket terveztünk és ezen gének kópiaszámát, illetve térképpozícióját meghatároztuk lucernában és *M. truncatulában* is (mivel a BAC-ok szekv. nem volt ismert, ezért részleges szekvencia meghatározást végeztünk és két kódoló szekvenciát választottunk ki a további kísérletekhez. Az *RPS13* gén egyik oldaláról (MtH2-6B12) a TC103525, a másik oldaláról (MtH2-20A12) pedig az AJ501201 szekvenciákkal jelzett géneket választottuk. A gének térképpozícióját hossz-polimorfizmus és/vagy RFLP alapján határoztuk meg. Azt az eredményt kaptuk, hogy ezek a gének lucernában és *M. truncatulában* is feltételezhetően egy kópiában vannak jelen (csak egy lokuszt amplifikálódott) és a LG4-re térképeződnek. Ez alapján valószínűsítettük, hogy a duplikációs esemény lucernában csak az *RPS13* gént és kisebb környezetét érinthette (nem terjedt ki a két vizsgált géntre, amelyek egy kontigba rendeződtek).

A kísérletek másik sorozata már a lucerna fizikai térképezésére irányult: BAC könyvtárat készítettünk a diploid lucerna F1/1 növényből (a térképező populáció F1 szülője) és ebben kívántuk azonosítani a *M. sativa* LG2 csoporton lévő *RPS13* gén körüli régiót. Az *RPS13* génre tervezett specifikus primerpárral (L408A3-B3) az ún. multiplex PCR módszerrel azonosítottuk az LG2-n lévő *RPS13* gén két - a *M. sativa* ssp. *coerulea*, ill. *M. sativa* ssp. *quasifalcata* - allélját hordozó BAC klónt (MsH1-163H7, ill. MsH1-148G10). Ezeket a BAC klónokat *HindIII* és *EcoRI* restriktív enzimekkel emésztettük és random szubklónoztuk pK19 vektorba. A már említett génspecifikus primerpár segítségével azonosítottuk azokat a szubklónokat, melyek hordozták az *RPS13* gén kópiát. Mindkét allélt hordozó BAC klón esetében 1-1 szubklónt (5 ill. 6 kb) sikerült azonosítani, melyeken meghatároztuk az *RPS13* kópia és annak közvetlen környezetének szekvenciáját. A szekvencia eredményekből megállapítottuk, hogy mindkét lucerna alfajban az LG2-n az *RPS13* gén egy töredéke, az öt exonból csak a teljes 5-ös és 4-es exonok és a 3-as exon egy kis része található meg, intronok nélkül (5. ábra). E szerkezeti felépítés alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a *M. sativa*-ban ez a génkópia egy mRNS molekulán keresztül, feltehetőleg retrotranszpozícióval épült vissza részleges a genomba, és az adatok alapján nem funkcionális gén. A visszaépült génszakasz a két allél között szekvencia szinten erősen konzerválódott, ami a szorosan a gén előtt lévő szekvenciáról is elmondható, ellenben a génrészlet tágabb környezetében csekély szekvencia azonosság ismerhető fel a két allél közt. A visszaépülés mind a két allélon (*coerulea*, *quasifalcata*) azonosan történt, tehát megállapítható, hogy bár a két *Medicago* faj (*sativa* és *truncatula*) szétválása után keletkezett, de a két *M. sativa* szülői egyed evolúciós elválása előtt.

A beépülés módjára adhat egy lehetséges választ az a megfigyelés, hogy a géntöredék (3. exon) előtt egy kb. 150 bp-os szekvenciáról egy MuMITE típusú transzpozonnal azonos tulajdonságokat mutat, ami szintén erősen konzerválódott a két allél között. A visszaépült génrészlet és a transzpozon-szekvencia között egy AT gazdag ismétlődés azonosítható, kb.100 bp hosszán. A transzpozon szekvencia előtt, a két allél között nem mutatható ki egyéb homológ szakasz. Mivel a két allél környezete erősen eltérőnek bizonyult, feltételezhető, hogy a *RPS13* génrészlet beépülése után az LG2-n jelentős változások mentek végbe az evolúció során a két szülői alfajban, elképzelhető lokális inverzió is, ám ennek kiderítésére további szekvencia információra lesz szükség a régióban.

A kiindulási megfigyelés, vagyis az egyedi deléziós esemény a térképező populáció egyik egyedében tehát az *RPS13* gén egy töredékes kópiáját érintette, így nem meglepő, hogy nem okozott fenotipikus különbséget. A delézió konkrét hosszának megállapítása még

folyamatban van, az eddig meghatározott és a még tervezett szekvencia információk segítségével tudjuk majd azonosítani a végpontjait. Előzetes adatok azt valószínűsítik, hogy a vizsgált régió elsősorban nem kódoló, hanem intergenikus DNS szakasz. Ugyanakkor egy evolúciós szempontból érdekes eseményt azonosíthattunk munkánk során.

1. 2. Levélvariegációt okozó mutáció azonosítása *M. truncatula*-ban

A térképezésen alapuló génizolálásra kiválasztott, levélfejlődéshez szükséges génben bekövetkezett mutáció zöld-fehér szektorokat tartalmazó, variegált levelek kialakulásához vezet. A levélvariegációt okozó mutáció térképezéséhez a *M. truncatula* A17 háttérben kapott mutáns és a *M. truncatula* A20 vonalak keresztezéséből létrehoztunk egy, a mutáns fenotípust szegregáló térképező F2 populációt. A mutáció és a genetikai alaptérképről kiválasztott markerek kapcsoltságának vizsgálatával megállapítottuk, hogy a mutációt szenvedett gén a kettes kapcsoltságú csoporton (LG2), az ACCO marker közelében helyezkedik el. A szegregáló populáció 205 egyedéből egy sem mutatott biztos rekombinációt a markerrel. Az ACCO marker segítségével azonosítottunk egy BAC klónt (MtH2-12M19), mely szekvenciája ismertté vált a Medicago Genom Program keretében. A BAC klón ACCO markerrel ellentétes végére tervezett SSR marker (GEP141/142) szintén nem mutatott biztos rekombinációt a populáció 205 egyedén. Ugyanakkor azonosítottunk olyan kódoló szekvenciát a BAC klónon, az ACCO és ezen GEP141/142 marker között, mely nagyfokú homológiát mutatott az *Arabidopsis thaliana Immutans* génnel, melynek mutációja szintén levélvariegációs fenotípust mutat, ezért ezt néztük meg közelebbről először.

Az *Immutans* gén egy plasztokinon oxigén:oxidoreduktázt kódol, melynek szerepe van a karotenoid bioszintetikus útvonalban és termiális oxidázként funkcionál a plasztiszokban. A *M. truncatula Immutans* homológ (*MtIM*) génre primereket terveztünk és amplifikáltuk a gént vad fenotípusú és mutáns növényből is. A mutánsban azonosítottunk a génben egy mutációt, ahol egy G->A nukleotid csere glutaminsav->lizin aminosav cseréhez vezetett. Szekvencia homológiák és analízis alapján elmondhatjuk, hogy ez az aminosavcsere az enzim vasion kötésében résztvevő egyik aminosavát érintette.

Annak igazolására, hogy valóban az általunk azonosított gén mutációja okozza a megfigyelt fenotípust, komplementációs kísérletet terveztünk, ahol mutáns *M. truncatula* egyedeket vad típusú *MtIM* gént hordozó *Agrobacterium tumefaciens* törzssel fertőztünk. Mivel a mutáns *M. truncatula* egyed nem hordoz embriogén tulajdonságot, ezért a hagyományos, szomatikus embriogenezisen alapuló *A. tumefaciens* transzformációs

megközelítés nem alkalmazható. A *M. truncatula* növényre a 2004. évben leírtak azonban egy új transzformációs módszert, az ún. sziklelevél-transzformációt, ezzel próbáltuk meg a komplementációt. A sziklelevél-transzformációs módszerrel eddig közel 400 csirából kiindulva 800 transzformációt indítottunk vad típusú *M. truncatula* A17 és zöld-fehér fenotípusú mutáns egyedekből. Eddig sikerült megfigyelnünk kb. 50 zöld (transzformáns) hajtáskezdeményt, azonban teljes transzformáns egyedeket még nem tudtunk regenerálni. A kísérleteket folytatjuk, és további kísérleti tényezők megváltoztatásával (pl. a transzformálásra kerülő csírák korának csökkentése) próbáljuk optimalizálni a körülményeket.

A mutációt szegregáló populációban megfigyeltünk olyan egyedeket is, melyek normális zöld, ún. revertáns leveleket/oldalágakat fejlesztettek. Kíváncsiak voltunk vajon van-e genetikai háttere ilyen revertáns oldalágak megjelenésének. Azt vizsgáltuk, történt-e back-mutáció, vagy egy második mutáció a *MtIM* génben. Az erre vonatkozó kísérleteket a *CeII* enzimet alkalmazó technikával (ld. lejjebb az összehasonlító térképezésnél) végeztük. Megvizsgáltuk több revertáns levél genotípusát a mutációt szenvedett génben, a teljes gént amplifikáló primerek segítségével. Összehasonlítottuk a mutáns és a vad fenotípusú egyedek genotípusával, illetve összehasonlítottuk az ugyanazon növényről származó mutáns és revertáns levelek genotípusát. Az eredményeink azt jelzik, hogy a revertáns oldalágról származó vad fenotípusú levelekből, illetve a mutáns fenotípusú levelekből származó *MtIM* szekvenciában *CeII* enzimmel különbséget nem lehetett kimutatni. Ebből következően nagy valószínűséggel a két eltérő fenotípusú levél genotípusa az *MtIM* génben megegyezik. Ezt megerősítette az a kísérleti eredmény is, hogy a revertáns oldalági magokból származó egyedek mutáns fenotípusúak.

2. Összehasonlító térképezés:

2.1. A *Medicago* fajok és a borsó genetikai térképeinek összehasonlítása

A pályázat keretében egyik célunk a diploid *Medicago* fajokra már elkészített genetikai térképek bővítése volt. A lucerna (*Medicago sativa*) és a pillangós modell növény (*Medicago truncatula*) genetikai térképein található molekuláris markerek számát kb. 2000-re, illetve a *M. truncatula* esetében nemzetközi együttműködésben kb. 800-ra terveztük növelni. A genetikai térképek bővítését főleg ismert szekvenciájú, illetve funkciójú gének térképhelyének megállapításával kívántuk végezni. Erre a célra az adatbázisból olyan kódoló

(EST - Expressed Sequence Tag) szekvenciákat választottunk, melyek specifikusak a pillangósvirágú növényekre, vagy növény- mikroorganizmus kapcsolatban van szerepük. Olyan markerek genetikai térképhelyének a meghatározását is vállaltuk, melyeket a pillangósvirágú növények genom-összehasonlító vizsgálataiban szereplő egyéb fajokban (pl. borsó) már korábban térképeztek. Az elmúlt évben nemzetközi együttműködésben megkezdődött a *M. truncatula* genom eukromatikus, génekben gazdag régióinak szekvenálása, melynek során először genetikai markerekkel azonosított BAC klónok nukleotidsorrendjét határozzák meg. Csoportunk részt vett ezen klónok kiválasztásában: hibridizációval, illetve multiplex PCR segítségével olyan BAC klónokat azonosítottunk, melyek a *M. sativa* populáción térképezett géneket hordoznak. A klónok szekvenálása után a szekvenciában azonosított rövid szekvencia ismétlődések, SSR-ek (Single Sequence Repeat) segítségével meghatározzuk a térképhelyzetüket a modellnövény genetikai térképén.

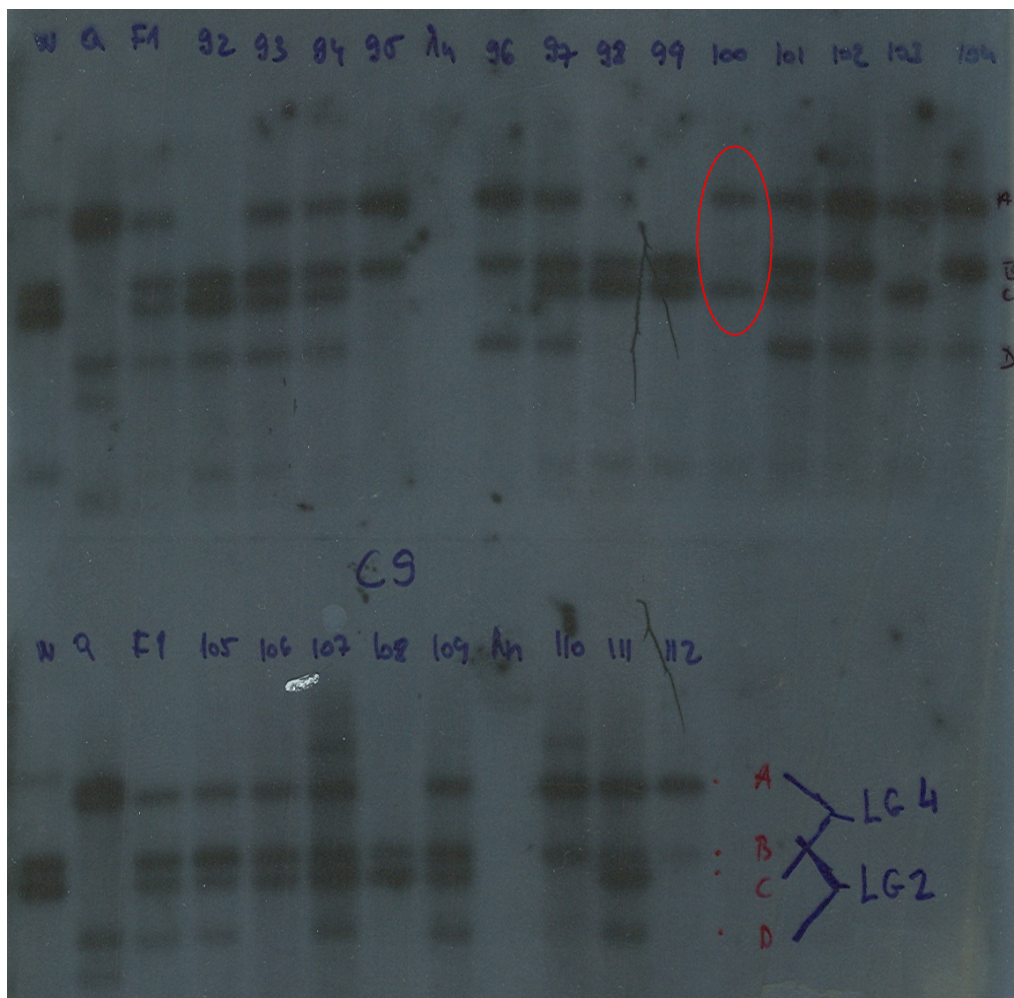
A markerek térképhelyének meghatározásához a térképező (szegregáló) *M. sativa* és *M. truncatula* populációk egyedeinek meghatároztuk a genotípusát a különböző markerekre nézve. A genotípusok meghatározásához főleg a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszereket használtunk. Azokban az esetekben amikor ezek nem vezettek eredményre, akkor restrikciós fragmentek hosszpolimorfizmusa (RFLP) alapján határoztuk meg a genotípusokat. A PCR-alapú genotipizáláshoz oly módon terveztünk primereket, hogy az adott gén egy vagy több intron szekvenciáját is amplifikáljuk (intron targeting). Az intron szekvenciák amplifikálásával nagyobb valószínűséggel azonosíthatunk különbségeket, és így nagy eséllyel mutathatunk ki polimorfizmust. A különbségek lehetnek egyszerű hosszkülönbségek, vagy egy restrikciós endonukleáz hasítóhely eltűnése/megjelenése, melyeket agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézis segítségével detektálunk restrikciós enzimmel történő hasítását követően (CAPS), illetve olyan szekvenciakülönbségek, melyeket az egyszálú DNS konformációjának különbözősége alapján (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism) tehetünk láthatóvá. Az előbbieken felsorolt technikák alkalmazásán kívül kidolgoztunk egy új, hatékonyabb eljárást polimorfizmus(ok) kimutatására, amely egyszerűségével és gyorsaságával hatékonyan kiválthatja a CAPS és az SSCP módszereket. A *CeII* enzimet alkalmaztuk genotipizálásra, mely felismeri a DNS két szála közötti párosodást megzavaró szekvenciakülönbségeket (mismatch, deléció-inszerció), s ott a heteroduplexet elhasítja. A módszer lényege az, hogy a térképező populáció egyedeinek genotipizálása során PCR-rel amplifikáljuk a térképezni kívánt DNS-szakaszt, majd a DNS denaturálását követően a szálakat hagyjuk renaturálódni. A heterozigótákból származó minták esetén a képződött termékek elméletileg 50%-a heteroduplex formában fordul elő, azaz az

egyik szál az anyai, a másik az apai szekvenciát hordozza, s szekvenciakülönbség esetén ezeket a DNS-eket az enzim hasíthatja, amely lehetővé teszi ezen egyedek azonosítását. Míg a mutációk detektálására eredetileg leírt módszereknél fluoreszcens festékes vagy izotópos (^{32}P) jelölést valamint szekvenáló apparátust alkalmaztak, mi kisméretű denaturáló poliakrilamid gélen és ezüsfestéssel mutatjuk ki a hasítási termékeket (6. ábra). A módszer előnye, hogy nem igényel előzetes szekvencia információt, drága restrikciós enzimeket vagy fluoreszcensen jelölt primereket, radioaktív izotópokat, és drága berendezések használatát. A meghatározott genotípusok alapján a markerek térképhelyzetét ezután a csoportunkban kifejlesztett szintérképzési eljárással határoztuk meg.

A projekt során több mint 150 marker helyzetét határoztuk meg a modellnövény genetikai térképein (F2, RIL), míg lucernán 135 génszekvencia segítségével 154 marker térképhelye vált ismertté. Azon lókuszok térképhelyzetének összehasonlításával, amelyek térképhelye mind *M. truncatula*-ban, mind *M. sativa*-ban ismert, a két faj kapcsoltsági csoportjai egymásnak megfeleltethetők. Kimutattuk, hogy több mint 180 gén-specifikus marker térképhelyzete a két fajban megegyezik, ami azt bizonyítja, hogy a két faj genomja a nukleoláris organizátor pozíciójától (Mt: LG5, Ms: LG6, és egy két specifikus szekvencia kivételétől - lásd RPS13) eltekintve kolineárisnak tekinthető. Néhány marker eltérő térképhelyzete azzal magyarázható, hogy egyes géncsaládok különböző tagjait térképeztük a két fajban. A hibridizáció (RFLP) és a BAC klónok fragmentjeinek mintázata, valamint az EST szekvenciák analízise alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy bizonyos gének eltérő számú kópiában vannak jelen a két faj genomjában, mint pl. U212 (Mt: 4, Ms: 5), PCT (Mt: 2, Ms: 1), RPS13 (Mt: 3, Ms: 4). Ezeknél a géncsaládoknál a fajok szétválása után az eltérő génduplikációs események felelősek az egyedi mintázatért.

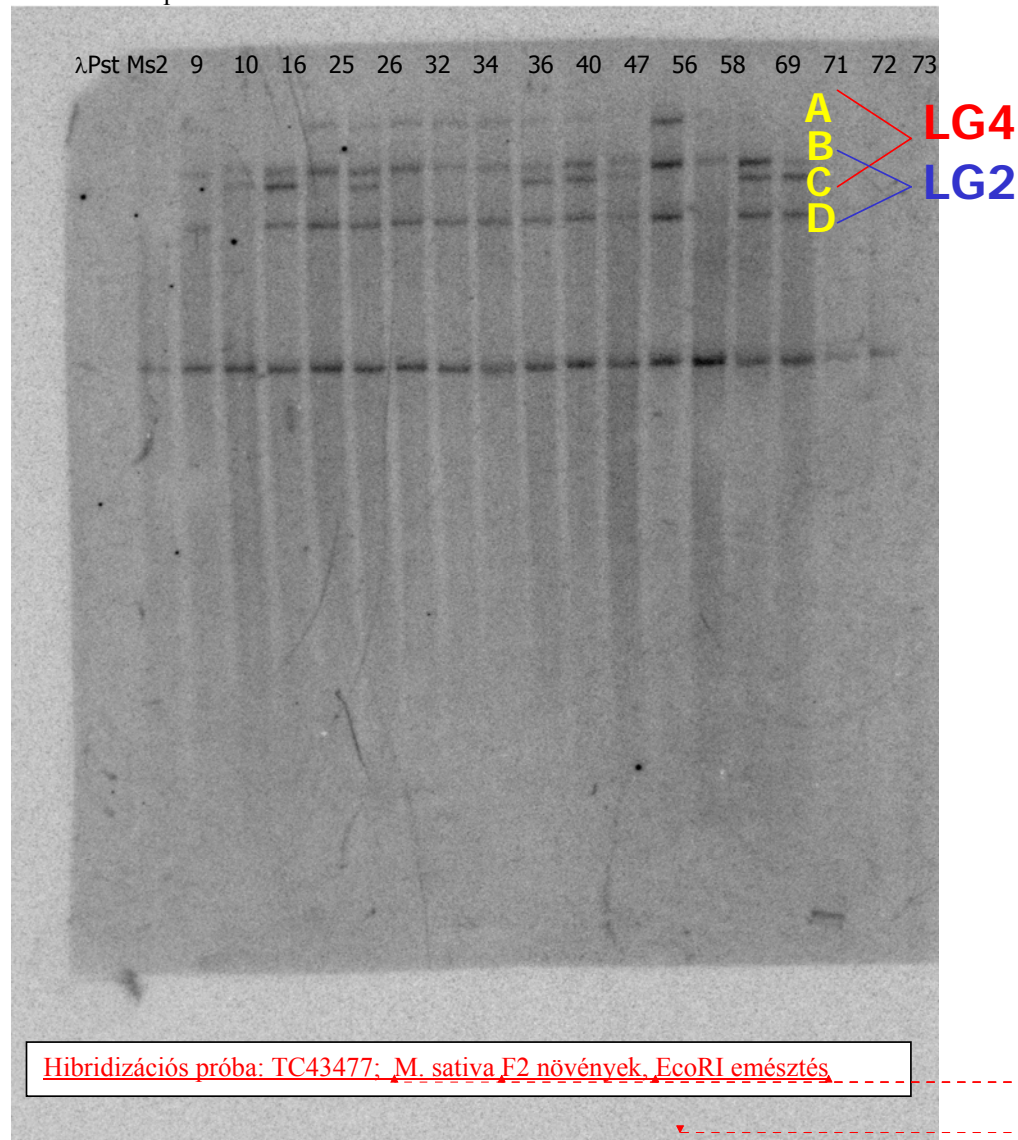
Az eltérő kromoszómaszámú borsó és lucerna genetikai térképeinek összehasonlításához a borsón már térképezett gének térképhelyzetét határoztuk meg lucernán. Közel 100 gén térképhelyzetének összehasonlításából megállapíthattuk, hogy a két faj genomja nagy mértékben kolineáris, s az eltérő kromoszómaszám pár nagyobb átrendezéssel megmagyarázható (7. ábra).

Törölt: 2



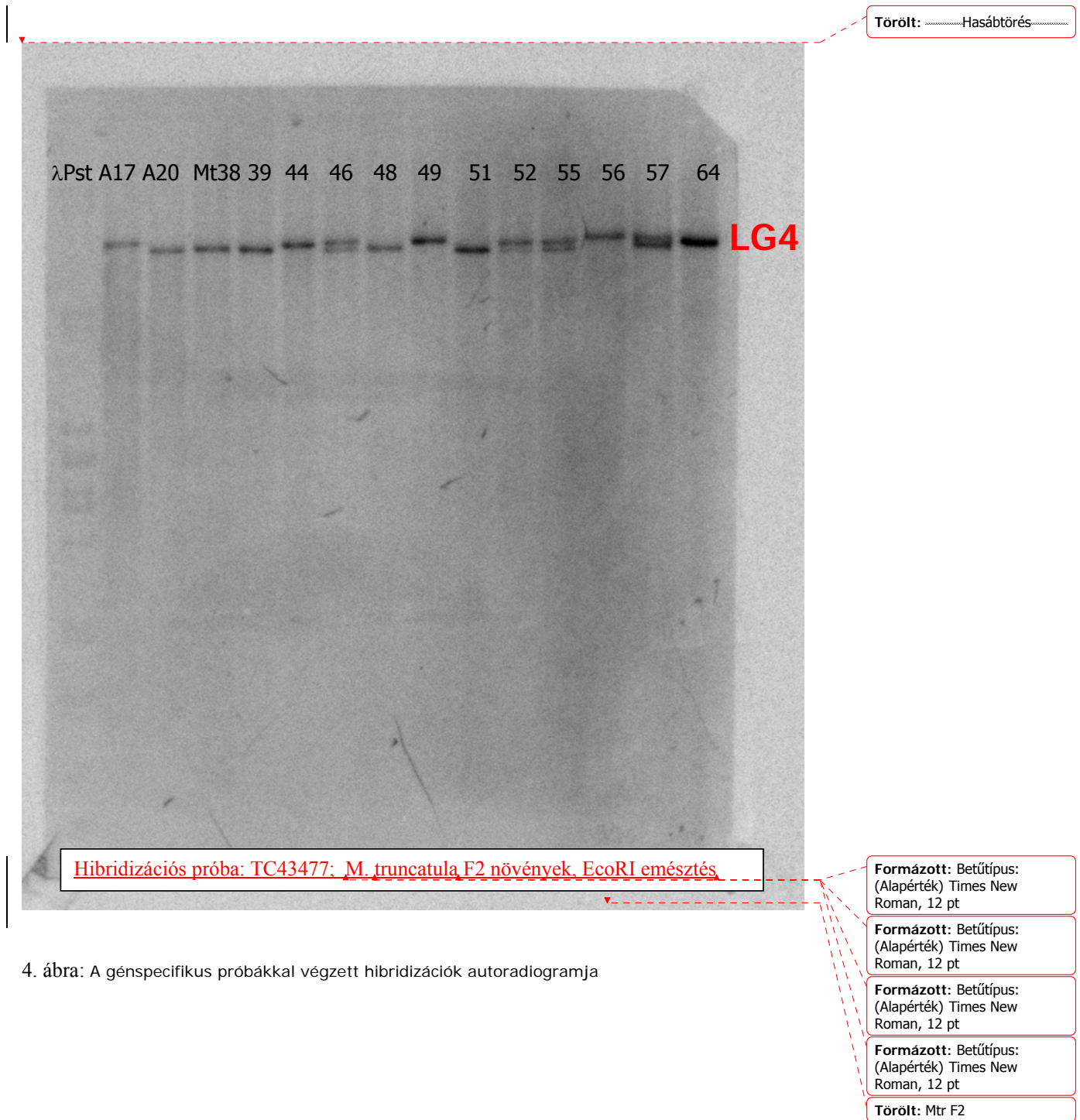
1. ábra: A L4o8-as eredeti autoradigramjának be-scennelt ábrája

Hibridizációs próba: TC43477

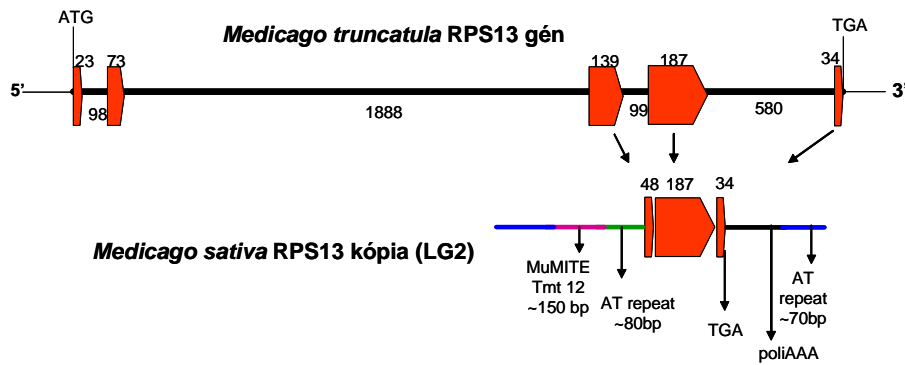


3. ábra: A génspecifikus próbákkal végzett hibridizációk autoradiogramja

- Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Times New Roman, 12 pt
- Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Times New Roman, 12 pt
- Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Times New Roman, 12 pt
- Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Times New Roman, 12 pt
- Törölt: Msat F2/EcoRI



4. ábra: A génspecifikus próbákkal végzett hibridizációk autoradiogramja



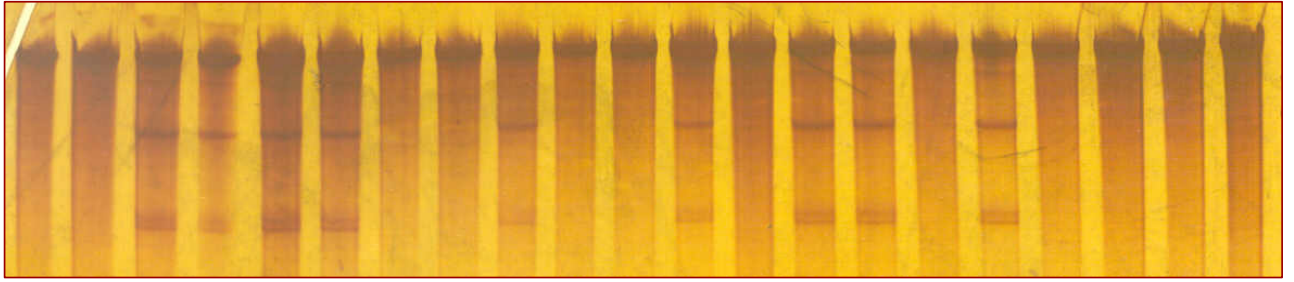
5. ábra: Az *RPS13* gén szerkezete a *M. truncatula* LG4 kapcsoltsági csoporton (teljes, funkcionális gén) és a *M. sativa* LG2-re visszaépült csonka kópia. A piros nyilak exonokat jelölnek, a számok a nukleotidok számát jelzik az adott szakaszokon.

Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Arial, 10 pt, Félkövér

Formázott: Betűtípus: 10 pt

Formázott: Betűtípus: (Alapérték) Arial, 10 pt, Félkövér

P₁ P₂ H F2 →

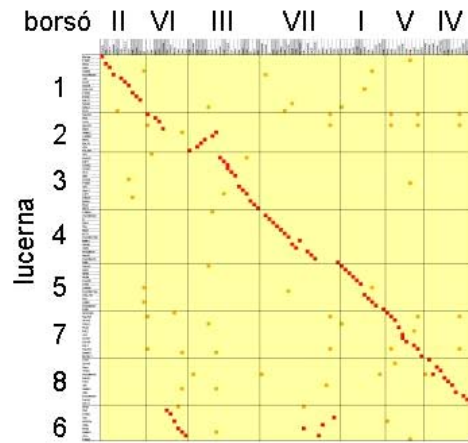


P₁ P₂ H F2 →

Formázott: Betűtípus: 11,5



6. ábra Demonstratív Cel I gélek (P- 1-2 szülői egtek, H- mesterséges heterozigóta F2- populáció egyedei)



7. ábra: A lucerna és borsó genetikai térképén elhelyezett gén alapú markerek pozíciója *dot-plot* ábrázolással.

Törölt: 2

cDNS szekvencia	SZEKVENCIA AZONOSSÁG (nukleotid/ aminosav)			
	L408 (AJ410087)	TC43477	TC45398	TC53731
L408 (AJ410087)	*	98% / 97%	81% / 93%	78% / 94%
TC43477	*	*	82% / 96%	80% / 96%
TC45398	*	*	*	86% / 96%
TC53731	*	*	*	*

1. táblázat: DNS és aminosav szekvenciák homógiasszintjének összehasonlítása

