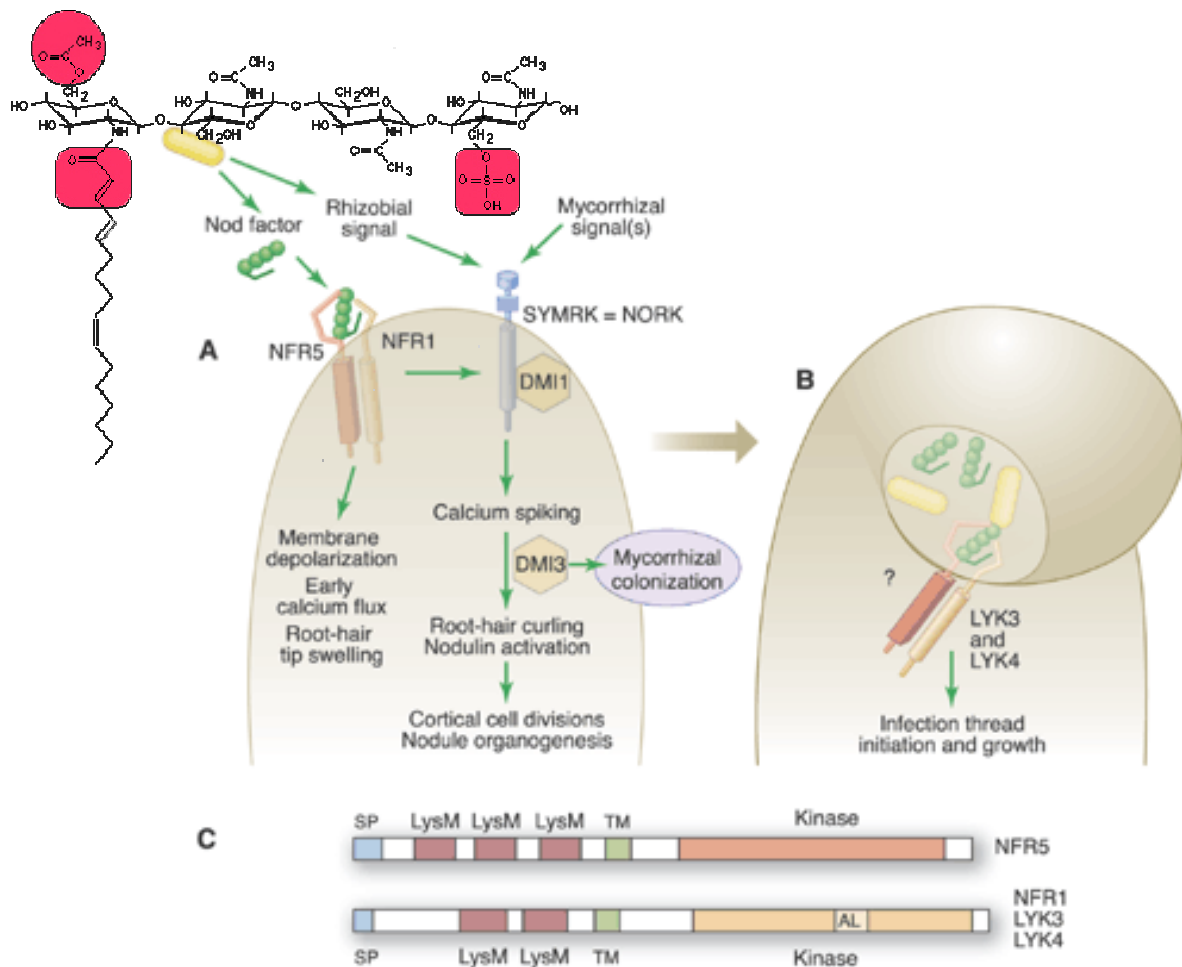


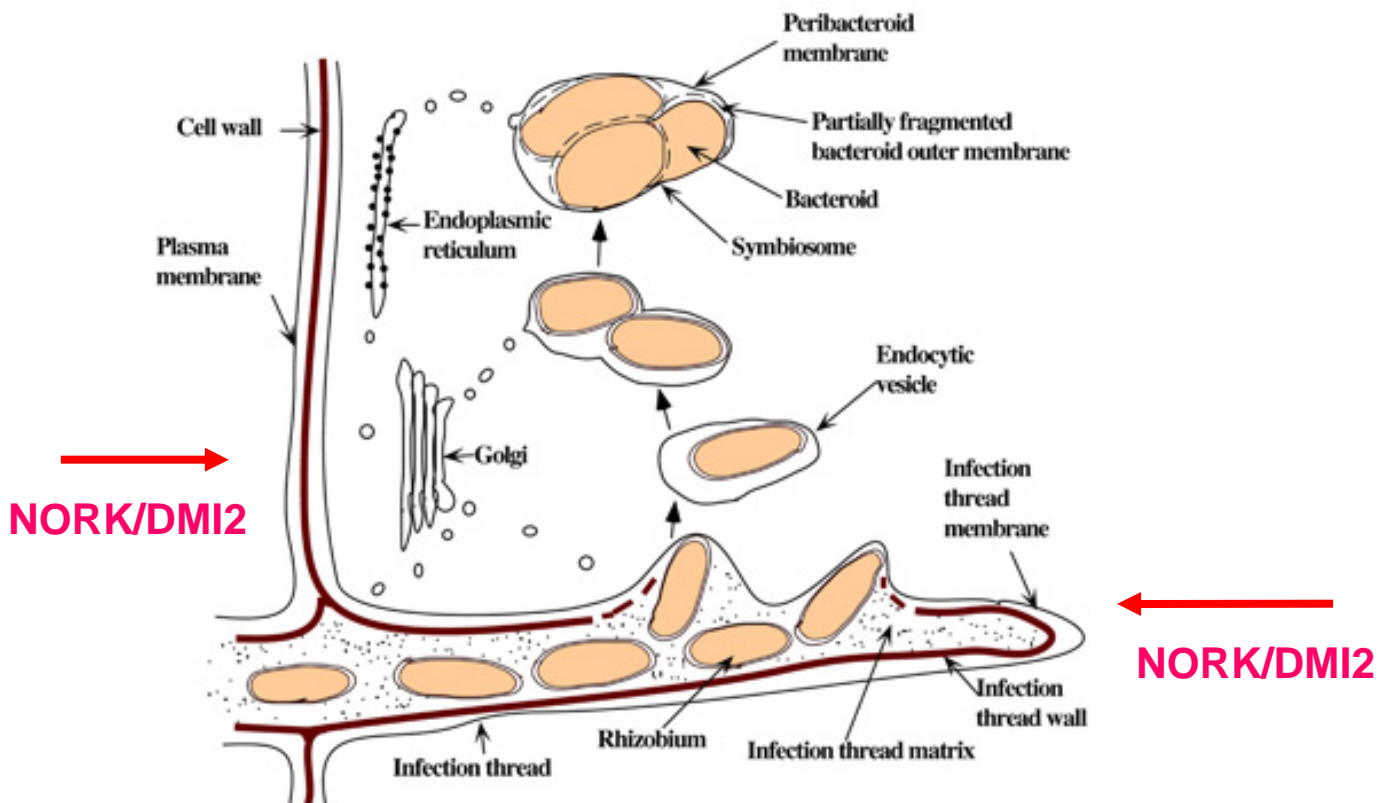
## Az eredmények összefoglalása

### Szimbiotikus nitrogénkötés

A modell rendszerünknek választott *Sinorhizobium meliloti* baktérium és a lucerna, *Medicago sativa* szimbiotikus kapcsolatának felderítéséhez vizsgáljuk a génlónozással azonosított *nork* gén által kódolt receptor fehérjét. A NORK (NOdule specific Receptor Kinase) receptor kináz típusú fehérje feltehetően a baktérium által kibocsátott un. Nod faktor felismerésében és a gümőképződés biológiai folyamatának beindításában játszik szerepet (1. ábra.) (Cullimore 2003). A fehérjét a szimbioszóma képződés során a plazma membránban és az infekciós fonal membránban lokalizálták (2. ábra.) (Limpens 2005).



1. ábra. Nod -faktor érzékelés folyamata



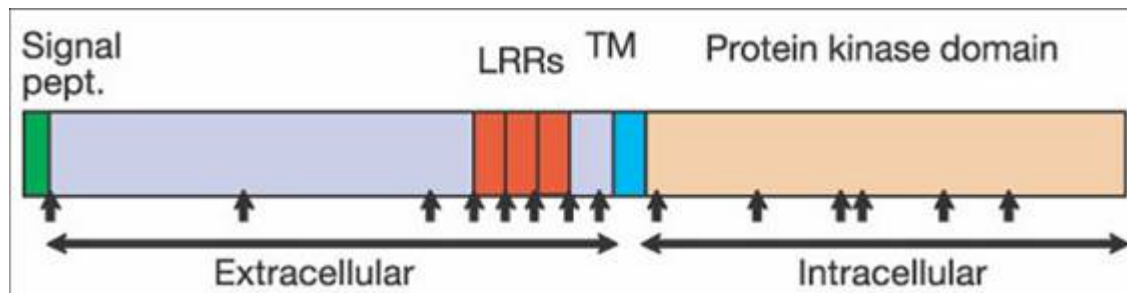
2. ábra. NORK lokalizálása a szimbioszóma képződés során

Célunk a NORK fehérjének, mint a lucerna szimbiotikus nitrogénkötés kialakításában kulcsfontosságú szerepet játszó receptor fehérjének molekuláris jellemzése volt, beleértve biokémiai tulajdonságainak felderítését, a fehérje azonosítását, lokalizálását, szerkezetének igazolását, valamint a szignál transzdukció kaszkád lépéseiből minél több elem azonosítását, amelyek valamilyen formában, kapcsolatban állnak a NORK fehérjével.

### NORK szerkezete

A 925 aminosavból álló receptor kináz molekula három fő szerkezeti doménből áll, egy extracelluláris (1-517), egy hidrofób transzmembrán (TM) (518-545) és egy intracelluláris (546-925) szerkezeti egységből. Az extracelluláris domén a szignál peptid (1-28) mellett egy egyedi szekvenciát hordozó NORKE (29-406) (NORK Extracelluláris domén) domént, 3 LRR-t (407-482) (Leucine Rich Repeat), az intracelluláris szerkezeti egység pedig aktív kináz

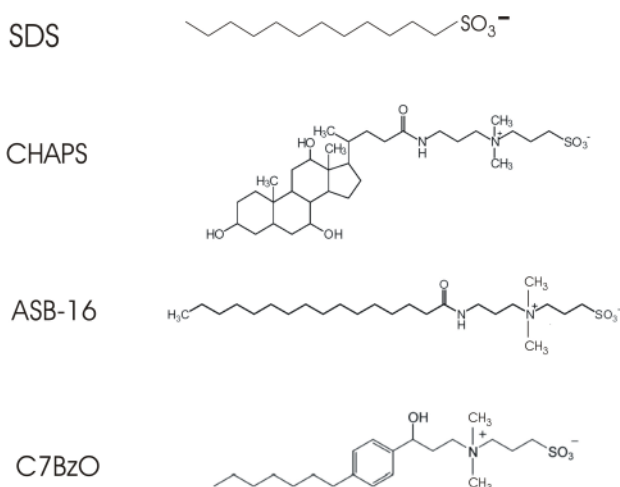
domént tartalmaz. A C terminális kináz régió tartalmazza a kinázokra jellemző konzervatív aminosav szekvencia szakaszokat az enzim katalitikus helyét meghatározó szekvenciával együtt DVKSSN (3. ábra.) (Endre 2002)



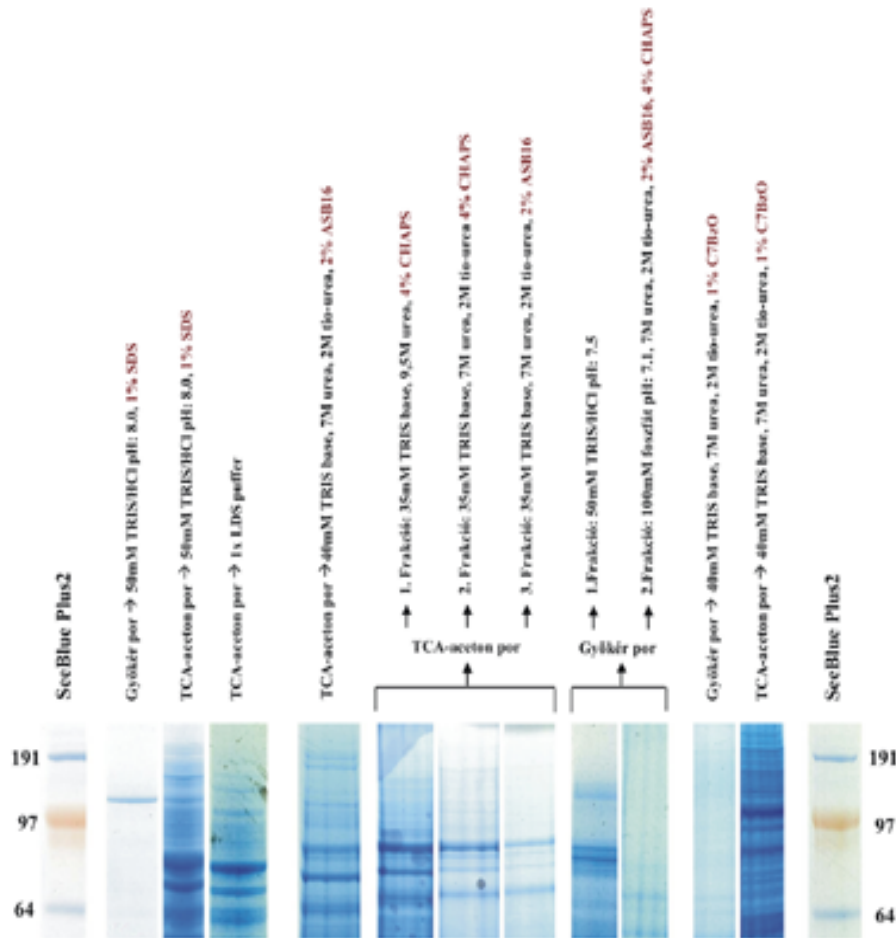
3. ábra. NORK szerkezete

### Receptor fehérje izolálása lucerna gyökérből.

A lucerna gyökér sejttal mechanikai feltárása közvetlenül cseppfolyós nitrogénben történt elporítással. Különböző detergenssek (SDS, CHAPS, ASB16, C7BzO) a sejtmembrán felbontását segítették elő (4. ábra), TCA/aceton a növényi fenolokat, proteáz inhibitorok az aktív proteázokat hatástalanították, míg a szonikálás a nukleinsavak tördelését eredményezte. A gyökér extraktumokat ezek után SDS gélelektroforézissel Novex Bis -Tris rendszerben, MOPS/SDS futtató pufferben analizáltuk és a Coomassival festett géleken ellenőriztük, hogy a feltárt sejt lizátum tartalmaz -e NORK méretű fehérjét (100KDa) (5. ábra).



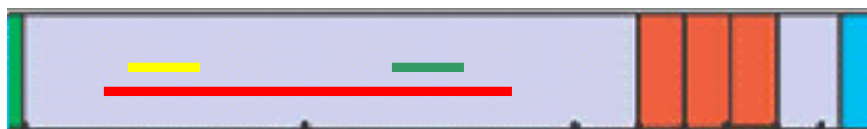
4. ábra. Detergenssek szerkezete



5. **ábra.** Lucerna gyökér extraktum elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel, detektálása Coomassie Blue G250 festékkel.

## Fehérjék azonosítása immundetektálással

A kimutatás egyik alapfeltétele, hogy rendelkezésünkre álljon megfelelő ellenanyag. Az ellenanyag készítéséhez antigéneket állítottunk elő a NORKE doménből választott immunogén szekvenciák alapján.



6. **ábra.** Az ellenanyagok előállításához kiválasztott antigének helye a NORKE extracelluláris részén  
 Piros: alfa NORK 33-349      Sárga: G3 67-81      Zöld: BV 222-236

## Antigének előállítása

### Peptide epitop előállítása szintetikus úton

A G3 és BV ellenanyag előállításához a peptid epitop antigént szilárd fázisú peptid szintézissel állítottuk elő, amit azután BSA-hoz konjugáltunk.

### Rekombináns DNS technikával készült fúziós fehérje előállítása GST prokarióta expressziós rendszerben, alfa-NORK ellenanyag előállításához

A NORKE domén 2. és 3. exonját használtuk antigénként az alfa NORK ellenanyag előállításához. A további tisztítás végett a fehérje szakaszt GST-vel fuzionáltattuk a következő konstrukció segítségével.

A pTrcHisA konstrukcióból a *M. truncatula* A17 NORK gén 2. és 3. exonját pGEX-4T-3 vektor BamH I/EcoR I helyére klónoztuk át. Az elkészített konstrukció:

kék: GST (Glutathione S- Transferase) szekvencia;

barna: NORK 2. exon;

rózsaszín: NORK 3. exon;

fekete: a pTrcHisA vektorból származó szekvencia (7. ábra a szöveg után).

A konstrukciót *E. coli* TOP10 baktériumtörzsbe transzformáltuk, szekvenáltuk és termeltettük a fehérjét. A termeltetett fúziós fehérje tisztítása egy lépésben Sepharose 4B hordozóra kötött glutation oszlopon történt, majd a részlegesen tisztított fehérje preparátumból a megfelelő mérettartományú fehérjét (~ 62 kDa) elválasztás után akrilamid gélből izoláltuk. Az izolált fehérje mennyisége 150 µg volt.

pGEX-4T-3Bam

```
ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT
M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L
TTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAA
L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K
TGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATATTGAT
W R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D
GGTGATGTTAAATTAACNCAGTCTATGGCCATCATACGTTATANANCTGACAAGCACAAAC
G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N
ATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTG
M L G G C P K E R A E I S M L E G A V L GST
GATATTAGATACGGTGTTTCCAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTT
D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V
GATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGCGAAGATCGTTTATGTCATAAA
D F L S K L P E M L K M F E D R L C H K
ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTTTGAT
T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D
```

GTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAA  
V V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K  
AAACGTATTGAAGCTATCCACAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCA  
K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A  
TGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGAT  
W P L Q G W Q A T F G G G D H P P K S D

*BamHI*

CTGGTTCCGCGTGGATCC

L V P R G S

GGGTTTGAGAGCATAGCATGTTGTGCTGATTCAAATTACACAGATCCAAAAACCACCCTA  
G F E S I A C C A D S N Y T D P K T T L  
ACTTATACAACAGATCACATCTGTTTCTCTGATAAAAGAAGTTGCAGACAAAATACCCGAA  
T Y T T D H I W F S D K R S C R Q I P E  
ATTTTGTTTAGCCACAGAAGCAATAAAAATGTTGAAAATTTGAAATATATGAAGGAAAG  
I L F S H R S N K N V R K F E I Y E G K  
AGATGTTATAATTTGCCAACAGTTAAGGATCAAGTATATTTGATAAGGGGCATATTTCCC  
R C Y N L P T V K D Q V Y L I R G I F P  
TTTGATAGTTTAAATTCTTCGTTTTATGTTTCGATCGGGTAACAGAACTAGGCGAATTA  
F D S L N S S F Y V S I G V T E L G E L  
AGATCGTCTAGGCTCGAGGACTTGAAAATTGAGGGAGTTTTTAGAGCCACCAAAGACTAC  
R S S R L E D L E I E G V F R A T K D Y  
ATAGATTTCTGCTTATTGAAGGAGGATGTCAATCCCTTCAATTTCTCAGATTGAATTGAGG  
I D F C L L K E D V N P F I S Q I E L R

Exon2

CCATTACCTGAAGAATACCTACATGGTTTTCGGTACTAGTGTTTTAAAAGTATAAGCAGA  
P L P E E Y L H G F G T S V L K L I S R  
AACAACTTTGGTGACACAAAATGATGATATAAGGTTCCAGATGACCAAAATGATAGAATC  
N N L G D T N D D I R F P D D Q N D R I  
TGGAAACGGAAAGAACTTCAACTCCAACATCTGCCCTTCCACTGTCTTTCAATGTCAGC  
W K R K E T S T P T S A L P L S F N V S  
AATGTTGACCTCAAAGACAGTGTACACCTCTCTACAAGTCTCAAAACAGCTTACT  
N V D L K D S V T P P L Q V L Q T A L T  
CACCTGAGCGATTGGAGTTCGTCATGATGGCCTCGAGACCGATGATTATGAATACTCT  
H P E R L E F V H D G L E T D D Y E Y S  
GTGTTTCTCCACTTTCTTGAAGTAAATGGCACTGTGAGCAGGACAAAGGGTGTGGAC  
V F L H F L E L N G T V R A G Q R V F D  
ATCTATCTAAACAATGAGATTAAAAAGGAGAAATTTGATGTTTTGGCTGGAGGGTCCAAG  
I Y L N N E I K K E K F D V L A G G S K  
AACAGTTACACTGCCTTGAACATTTAGCAAAATGGATCACTCAATATAACCTTAGTCAAG  
N S Y T A L N I S A N G S L N I T L V K

Exon3

*PstI*

GCATCTGGATCTGAGTTTGGACCCCTTTTGAATGCCTATGAAATCTGCAG

A S G S E F G P L L N A Y E I L Q

*EcoRI*

CTGGTACCATATGGGAATTC

L V P Y G N S R V D S S G R I V T D Stop

pTRChis

pGEX-4T-3EcoRI

7. ábra. GST-NORK konstrukció szekvenciája a restrikciós helyek jelölésével

## Ellenanyagok előállítás

Mindhárom ellenanyag standardimmunizálással nyúlban történt.

### **Poliklonális ellenanyagok tisztítása**

A vérből ammónium szulfátos kicsapással és Protein G affinitás kromatográfiával tisztítottuk az ellenanyagokat.

### **Tisztított GST-fúziós fehérje elleni poliklonális ellenanyag specificitásának ellenőrzése**

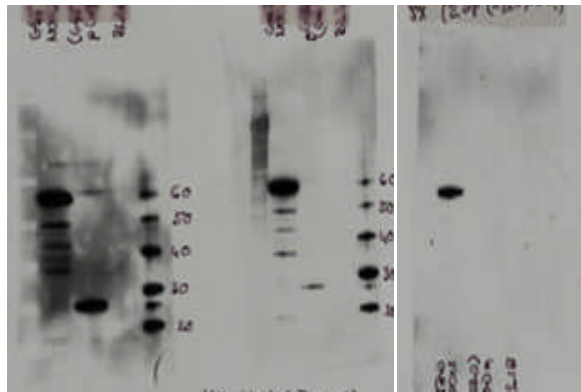
A poliklonális ellenanyagaink a feltételezett NORK fehérje mellett számos egyéb fehérjét is detektálnak a gyökér extraktumban. Kimerítéses módszerrel próbáltuk az azonosítást a NORK-ra kizárni.

Példaként mutatom be a GST fúziós fehérje ellen készült ellenanyag, az alfa NORK specificitását Western blotton. A 8. ábrán bemutatott elektroferogramokat kaptuk a rekombináns baktérium lizátum elválasztott fehérjeire. A Western blotton az előhívás ECL technikával tormaperoxidázzal jelölt anti nyúl másodlagos ellenanyaggal készült. Összehasonlításként kontrol baktérium lizátumokat is láthatunk a GST-NORK konstrukciót hordozó BL21 baktérium (BL21/pGEX/NORK) (1) lizátum mellett: üres BL21 baktérium (3), GST konstrukciót hordozó BL21 baktérium (BL21/pGEX)(2). Látható, hogy a GST-NORK konstrukciót hordozó baktérium lizátumon az ellenanyag a várható GST-NORK fehérje sávon kívül (62 kDa) számos egyéb fehérjét is detektál, amit sikerült kimerítenünk a GST konstrukció lizátumával. A kimerítést az ellenanyaggal történő inkubálásnál különböző arányban az oldathoz adott BL21/pGEX baktérium lizátum hozzáadásával végeztük.

1 2 3

1 2 3

1 2 3



A

B

C

### 8. ábra. Ellenanyag specificitás ellenőrzése

A: 0 ml BL21/pGEX lizátum + 10 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

B: 1 ml BL21/pGEX lizátum + 9 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

C: 5 ml BL21/pGEX lizátum + 5 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

MW GST: 26 kDa

MW GST +NORK 2+3 exon: 62 kDa

1: BL21/pGEX/NORK      2: BL21/pGEX      3: BL21

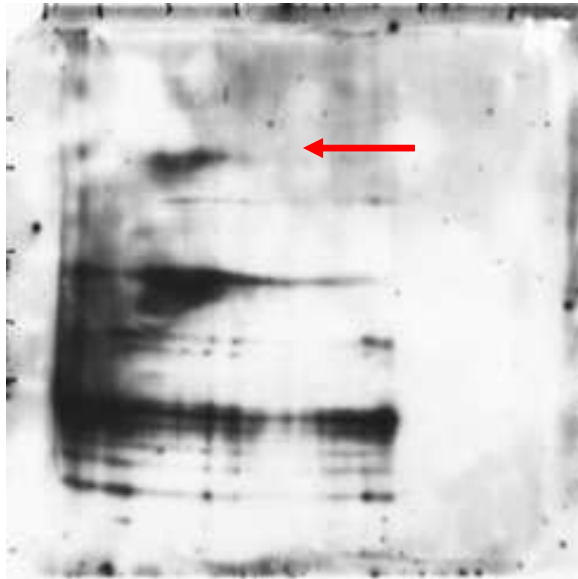
### Két -dimenziós poliakrilamid gélelektroforézis NORK fehérje analízisére

Miután az ellenanyagok tulajdonságait megismertük, a gyökér extraktumból két-dimenziós elektroforézissel elválasztottuk a fehérjét és immunblotton azonosítottuk. A 9. és 10. ábrán ugyanaz a blot két különböző ellenanyaggal történő detektálása látható.

pH 4.0 5.0 5.5 6.0 7.0



MW  
kDa  
97  
64  
51  
39

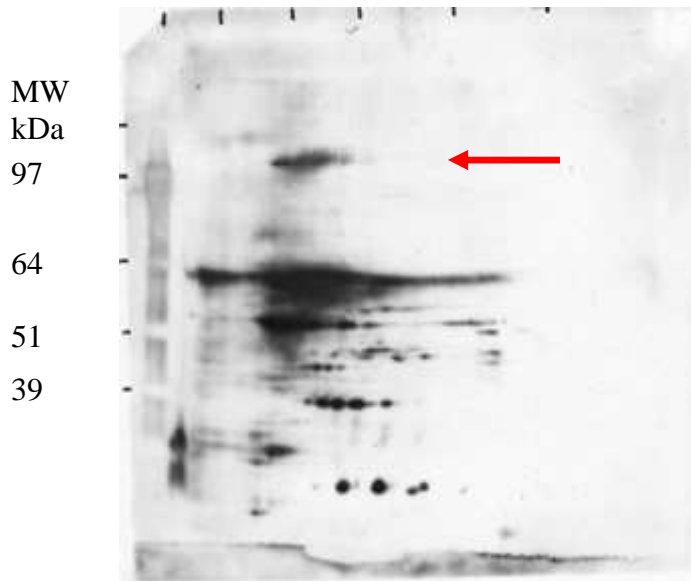


9. **ábra.** NORK fehérje azonosítása 2D gélen  $\alpha$ NORK ellenanyaggal.

350  $\mu$ g fehérjét választottunk el első dimenzióban pH 3-10 NL IPG gélen, míg második dimenzióban 4-12 % BisTris gélen MOPS SDS rendszerben.

A Western blottot 2000X  $\alpha$ NORK elsődleges ellenanyaggal és 50 000X anti nyúl másodlagos ellenanyaggal ECL Plus detektálással hívtuk elő. A NORK-nak megfelelő jelet nyíllal jelzem (MW 100KDa, IP 5, 2)

pH 4.0 5.0 5.5 6.0 7.0



**10. ábra.** NORK fehérje azonosítása 2D gélen G3 ellenanyaggal.

350 µg fehérjét választottunk el első dimenzióban pH 3-10 NL IPG gélen, míg második dimenzióban 4-12 % BisTris gélen MOPS SDS rendszerben.

A Western blottot 5000X G3 elsődleges ellenanyaggal és 50 000X toma peroxidázzal konjugált anti nyúl másodlagos ellenanyaggal ECL Plus detektálással hívtuk elő.

Ez az ellenanyag is a NORK-nak megfelelő (MW 100KDa, IP 5, 2) jelet adta. Látható a 9. és 10. ábra összehasonlításából, hogy a többi, ellenanyag által detektált fehérje nem egyezik meg.

Mivel a lucerna gyökérből nem tudtunk eddig olyan mennyiségben előállítani fehérjét, hogy N-terminális szekvenálással, vagy MALDI analízissel azonosítani tudjuk, ezért nagyobb mennyiségű fehérje előállítását tranziens expresszióval dohánylevélben végeztünk, amiből aztán immunprecipitációval próbáltunk fehérjét kinyerni.

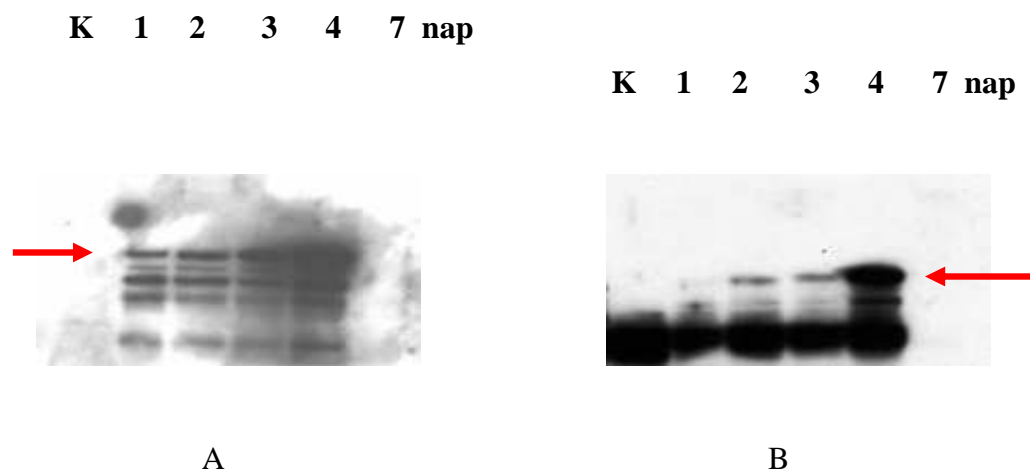
## NORK fehérje termeltetés tranziens expresszióval dohánylevélben *Agrobacterium tumefaciens* segítségével

*Agrobacterium tumefaciens* infiltrálással a következő rekombináns fehérjéket termelő génkonstrukciókat juttattunk be a dohánylevélbe:

1. *Agrobacterium* konjugátum készítése NORK ill. epitop jelzett NORK fehérjével
  - a. C53C1 *Agrobacterium tumefaciens* törzs
  - b. pBin 61S NORK, pBin 61S-NORK-c-myc, pBin 61S NORK-HA vektor konstrukciók, *E.coli*
  - c. pRK helper plazmid, *E.coli*
2. *Agrobacterium* konjugátum készítése P14 szupresszor fehérjével a fent leírt módon.

Az infiltrált dohánylevél SDS-feltáró pufferrel készített fehérje extraktumából sikerült kimutatni a NORK fehérjét Western bloton NORK fehérje elleni (G3, alfa NORK) ill. az epitoppal jelölt konstrukciók esetén a megfelelő tag elleni (anti-c-myc, anti -HA) ellenanyagokkal is (11. ábra.).

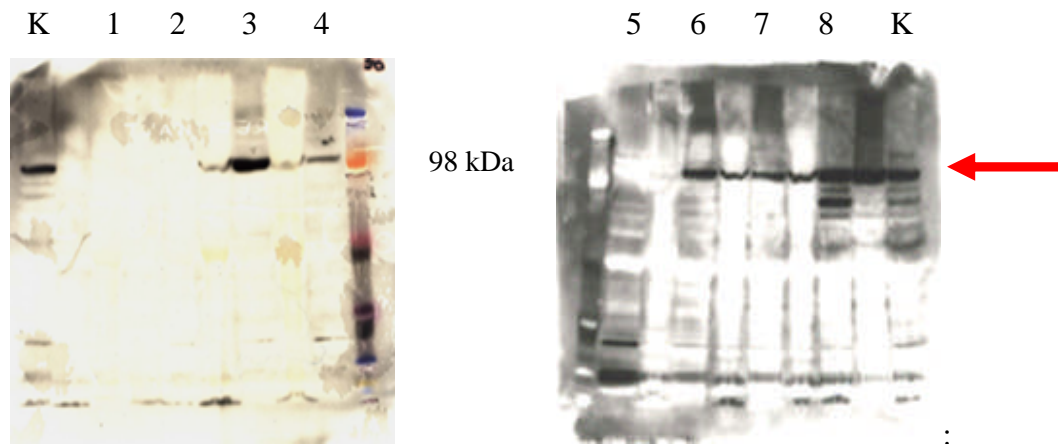
Látható a kinetikából, hogy az infiltrálást követő 4. napon kaptuk a legintenzívebb expressziót.



**11. ábra.** Tranziensen expresszált NORK fehérje kinetika anti c-myc (A) és G3 (B) ellenanyagokkal történt detektálással.

## Kísérletek rekombináns NORK fehérje izolálására immunprecipitációval dohánylevélből

Miután sikerült tranziens expresszióval dohánylevélben rekombináns NORK fehérjét és c-myc epitoppal jelölt változatát is termeltetnünk, a fehérjét dohánylevél extraktumból immunprecipitációval próbáltuk kinyerni anti –NORK (G3) ill. anti –c-myc ellenanyagokkal. Mivel SDS feltáró pufferben nem tudunk immunprecipitációt végezni, először a megfelelő detergenst tartalmazó feltárás körülményeit kellett optimalizálnunk.



**12. ábra.** Különböző detergenst tartalmazó feltáró puffer rendszer tesztelése Western blotton c-myc epitoppal jelzett NORK fehérjén. Az 5. számú feltáró pufferhez adtuk a különböző detergenst a következő mennyiségben:

**1:** 2% ASB-16, 0,1 % SDS; **2:** 0,5% OG, 0,1 % SDS; **3,7:** 4% CHAPS, 0,1 % SDS;

**4:** 1% C7BzO, 0,1 % SDS; **5:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS/HCl pH:8,0; **6:** 4% CHAPS

**8:** 2% SDS

Az eredmények alapján a továbbiakban csak a 4% CHAPS (6) detergenst tartalmazó feltáró puffert használtuk az immunprecipitáció során a következő kísérleti körülményeket alkalmazva:

1. *Agrobacterium tumefaciens* segítségével NORK (A) ill. NORK-c-myc (B) fehérjét termeltünk tranziens expresszióval dohánylevélben.

2. Az infiltrált levélből 4 % CHAPS detergenst és proteináz inhibitor koktélt tartalmazó lízis pufferben feltártuk a sejteket.

Adott ideig tartó szonikálás (10 ciklus: 5 sec on /3 sec off) és jégen történt 40 min inkubálás után lecentrifugáltuk a mintát.

3. Az endogén immunglobulinok eltávolítása céljából a felülúszóhoz lízis pufferrel egyensúlyba hozott Protein G agarózt adtunk. A Protein G fehérje különböző immunglobulinok konstans Fc régiójához kötődik.

Inkubálás után (4 °C, 1h) a mintát lecentrifugáltuk.

4. A tiszta felülúszóhoz G3 poliklonális (A) ill. a (B) esetben anti c-myc monoklonális ellenanyagot adtunk. Az ellenanyag variábilis része, Fv felismeri az antigéneket és hozzákötődik, immunprecipitáció történik.

5. Inkubálás (4 °C, 1h) után ismét Protein G agarózt adtunk a rendszerhez, és 4 °C-n további 1h keresztül inkubáltuk. A Protein G felismeri az előbbi ellenanyagok Fc régióját és hozzákötődik. Ezzel a lizátumból kikötjük az ellenanyagot a hozzákapcsolódott antigén fehérjével (A: NORK ill. B: NORK c-myc) együtt.

6. Az agaróz gyöngyöket centrifugálással összegyűjtöttük és lízis pufferrel alaposan átmostuk.

7. SDS minta előkészítő pufferrel eluáltuk az antigént.

8. SDS gélelektroforézissel elválasztottuk a fehérjéket.

9. Western blottot készítettünk.

10. Immundetektálással azonosítottuk az eluált antigéneket: A: NORK) ill. B: NORK-c-myc.

Jelenleg nagyobb mennyiségben próbálunk dohánylevélből fehérjét izolálni. Amennyiben sikerül az eddig csak immunológiailag detektált fehérjét megszekvenálni, akkor ezek alapján a fehérjét a lucerna gyökérből is azonosítani tudjuk.

Kísérletek folynak továbbá a NORK partner fehérjék keresésére élesztő két-hibrid rendszer segítségével (LYK3, NFP) .

Az eddigi eredményekből jelenleg készülő publikációt szeretnénk később bejelenteni.

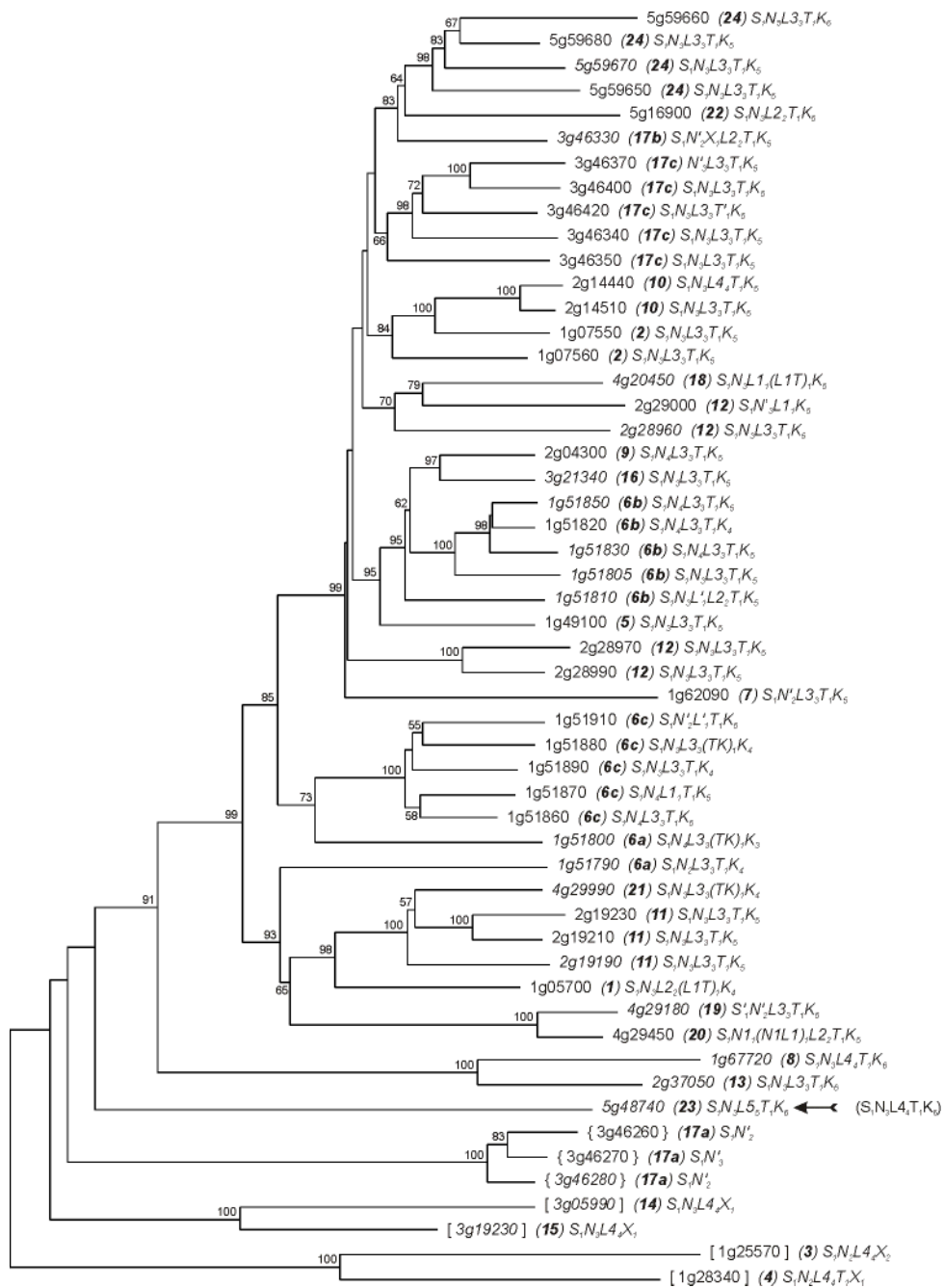
## Filogenetikai elemzések

A NORK vagy SYMRK fehérje (nodulation receptor kinase vagy symbiosis receptor kinase) extracelluláris régiójának (NORKE) nagy részét alkotó, a szignál peptid és az LRR-ek között elhelyezkedő doménhez hasonló szekvencia (NORKE sequence like domén., NSL) számos növényi receptor-szerű kinázban (receptor like kinase, RLK) megtalálható. Az NSL domén valamint a 2-5 LRR (leucine-rich repeat) jelenléte az RLK fehérjék LRR1 csoportjára jellemző.

Filogenetikai elemzéseket végeztünk annak megállapítására, hogy a pillangósvirágú növényekben található NORK/SYMRK fehérjék az LRR1 családon belül milyen evolúciós pozíciót foglalnak el, és a teljes géncsalád evolúciójában milyen mechanizmusok játszhattak szerepet. Arra is választ kerestünk, hogy a NORK/SYMRK gén homológjai megtalálhatók-e szimbiotikus nitrogénkötésre nem képes növények genomjában is.

Az LRR1 fehérjecsalád génjeinek részletes *in silico* elemzését elvégeztük az *Arabidopsis thaliana* genomban, az elsőként rendelkezésre álló és máig legjobban annotált növényi genomszekvenciában. Az *A. thaliana* teljes genomi szekvenciájában megkerestük az összes olyan gént, amelyek feltételezett fehérjeterméke az NSL szekvenciát is tartalmazza. Az NCBI adatbázisában megtalálható – elsősorban számítógépes génelőrejelzésen alapuló – *Arabidopsis* genomannotáció e gének jelentős részénél ellenőrzésre és javításra szorult. Az 53 azonosított gén közül négy bizonyítottan pszeudogén: a kérdéses régió szekvenciájának ellenőrzése megerősítette a kereteltolódási ill. korai terminációt okozó mutáció jelenlétét. A 49 feltételezett aktív gén többsége a NORK fehérjével rokon – az LRR1 csoportba tartozó – receptor típusú kinázt kódol. Négy fehérje nem rendelkezik kináz doménnel, további hátról pedig a transzmembrán régió is hiányzik. A multigén-család tagjai az öt *Arabidopsis* kromoszómán elszórtan helyezkednek el, egyedileg illetve több közel rokon gént egymás mellett tartalmazó klaszterekben.

Megvizsgáltuk az *Arabidopsis* NSL fehérjék filogenetikai kapcsolatait mind az NSL régió, mind a kináz domén szekvenciája alapján. Itt csak az NSL szekvenciák alapján készült fát mutatjuk be (13. ábra). A két filogenetikai fa jó összhangban van egymással, ami az NSL és a kináz domén koevolúciójára utal a géncsaládon belül. A leucin-gazdag ismétlődések (LRR) száma többnyire három, de hat fehérje négy LRR-t, egy pedig öt LRR-t tartalmaz. Mivel az egyes LRR-eket kódoló exonokat azonos fázisú intronok választják el egymástól, a régiót érintő egyenlőtlen crossing over az LRR-ek számának megváltozását vonja maga után.



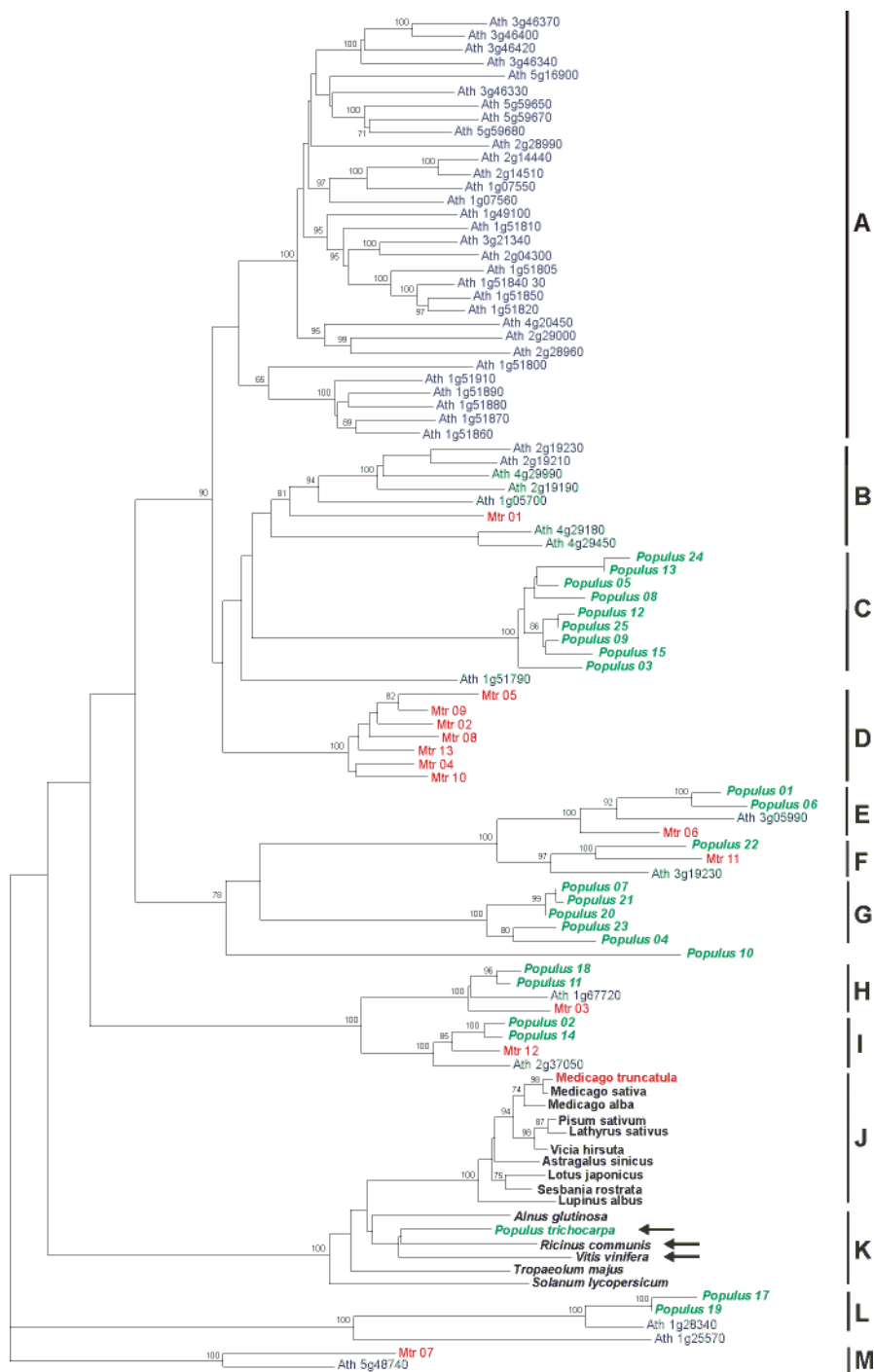
**13. ábra.** 53 prediktált paralóg *Arabidopsis* gén által kódolt LRR1 RLK fehérje filogenetikai kapcsolatai az NSL domén alapján. A fehérjéket a gének szokásos kódjával jelöltük, ahol a „g” betű előtt a kromoszóma száma, utána a gén száma áll. A filogenetikai fát a PHYLIP programcsomag *protdist* és *fitch* programjaival készítettük (Felsenstein, 2005). A távolságmátrix számításához a JTT aminosav-helyettesítési modellt használtuk (Jones és mti., 1992), a fa topológiáját és az ághosszakait a Fitch-Margoliash módszerrel becsültük. A gyökér nélküli fát a *retree* programmal, középpontos módszerrel alakítottuk a fenti formára. A vizualizáláshoz a *drawgram* programot használtuk. Az 1000 véletlen mintavételezéssel végzett bootstrap analízishez a fentiekén kívül felhasználtuk a *seqboot* programot is. Az 50 % feletti bootstrap értékeket tüntettük fel az ábrán. Dőlt betűvel szedtük az EST konszenzus szekvenciával alátámasztott, kifejeződő gének azonosítóját. Szögletes illetve kapcsos zárójellel jeleztük azokat a feltételezett fehérjéket, melyek nem tartalmazzák a kináz domént illetve az LRR szekvenciákat sem. Zárójelben vastagított számmal jelöltük a génklasztert, ahol kis betű jelzi a pozicionális és filogenetikai információk alapján megállapított szubklasztert. A fehérje doménszerkezetét leíró kódban nagy betűvel a domének jele és száma, alsó indexben az exonok száma olvasható (S: szignál peptid, N: NSL domén, L: LRR, T: transzmembrán hélix, K: kináz domén, X: ismeretlen, a családban nem konzervált szekvencia). A nyíl a NORK/SYMRK fehérjéhez leginkább hasonlító *Arabidopsis* fehérjére mutat (zárójelben a NORK fehérje doménstruktúrája).

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az LRR1 fehérjét kódoló géncsalád amplifikációja több lépésben, hosszabb evolúciós időszakokon átívelően zajlott le. Szerepet játszhatott benne az *Arabidopsis* genom akár többszöri duplikálódása, aminek nyomai szegmentális duplikációk formájában mutathatók ki a genomban (Vision és mti., 2000). A klasztereken belüli viszonylag friss duplikációk valószínűleg egyenlőtlen crossing over események során jöttek létre.

A nyárfa (*Populus trichocarpa*) teljes genomszekvenciájában valamint a *Medicago truncatula* genom eddig meghatározott szekvenciájában prediktált fehérjekódoló gének közül megkerestük azokat, amelyek az LRR1 családba tartozó, NSL-doménnel rendelkező fehérjét kódolnak, és rokonsági kapcsolataikat az *Arabidopsis* LRR1 fehérjével közös filogenetikai fán ábrázoltuk (14. ábra). A nyárfa genomban 25 homológ gént találtunk. Kimutattuk, hogy közülük egy a NORK gén ortológja, ami a VII-es kapcsoltsági csoportban (LG VII), a *M. truncatula* NORK génjével szintenikus régióban helyezkedik el (Kevei és mti., 2005). A szekvenálás alatt álló ricinus (*Ricinus communis*) és szőlő (*Vitis vinifera*) genomban szintén azonosítani tudtuk a NORK homológját (14. ábrán nyíllal jelölve). A homológiát bizonyítja, hogy a filogenetikai fán az ismert NORK/SYMRK fehérjékkel és homológjaikkal azonos csoportba klasztereződnek (14. ábra, J és K csoport együtt). Ez a csoport a fa többi ágától jelentősen elkülönülve alkot egy 100 % bootstrap értékkel támogatott monofiletikus csoportot. Mindez arra utal, hogy ez a fehérje az LRR1 családon belül egy ősi leszármazási ágat képvisel, ami korán divergálódott az LRR1 család többi tagjától. Génjét eddig csak egy kópiában sikerült kimutatni azokban a fajokban, ahol megtalálták. E fajok között több olyan van, ami nem vesz részt gümőképzéssel járó szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolatban. Ezekben a növényekben (14. ábra, K csoport) a NORK/SYMRK fehérje rokonai valószínűleg az arbuskuláris mikorrhizát (AM) alkotó gombákkal való szimbiózisban vesznek részt (Zhu és mti., 2006). Ugyanakkor, *Arabidopsis*-ban nem található meg a NORK/SYMRK homológja, még a szintenikus régiókban sem (Kevei és mti., 2005; Zhu és mti., 2005), tehát vagy a foszfátfelvételben szerepet játszó AM szimbiózis nem általános, vagy a NORK/SYMRK-val homológ fehérje nélkülözhető a folyamatban.

A *Medicago truncatula*-ban eddig 14, az LRR1 családba tartozó fehérje génjét sikerült azonosítani. A *M. truncatula* eukromatikus genomszekvenciájának azonban még csak kb. 2/3-a ismert, ezért a szekvencia-meghatározás előrehaladtával a család további tagjainak kimutatása várható.





**14. ábra.** A NORK/SYMRK fehérje és homológjai monofiletikus csoportot alkotnak az LRR1 RLK fehérjecsaládon belül. A filogenetikai fa genomai szekvenciákból prediktált LRR1 fehérjéket (*Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* és *Medicago truncatula*) valamint a NORK/SYMRK fehérjék ismert homológjait (a UniProt adatbázisból) illetve két szekvenálás alatt álló genomból (*Ricinus communis* és *Vitis vinifera*) általunk prediktált homológjait tartalmazza (utóbbiak és a *Populus*-ban található NORK ortológ nyíljal jelölve). Az *Arabidopsis* (Ath, kék színű) fehérjéket a gének szokásos kódjával jelöltük (a pszeudogéneket elhagytuk). A nyárfa (*Populus*, zöld színű) és *Medicago truncatula* (Mtr, piros színű) fehérjék számozása önkényes. A NORK/SYMRK homológokat (J és K csoport) a teljes fajnévvel és vastag betűvel tüntettük fel, dőlt betűvel szedve a szimbiotikus nitrogénkötéssel nem rendelkező fajokat (K csoport). A filogenetikai fát az NSL domén szekvenciája alapján, az 1. ábránál leírt módon készítettük, azzal a különbséggel, hogy a fa topológiáját és az ághosszakat a „neighbor-joining” módszerrel becsültük (neighbor program), a bootstrap analízist pedig 500 mintával végeztük. Az ábrán a 70 % feletti bootstrap értékeket tüntettük fel.

Az LRR1 fehérjecsald filogenetikai kapcsolatait szemlélve látható, hogy a család egyes tagjai kis kópiaszámban, de több – gyakran mindhárom – fajban megtalálhatók (14. ábra; E, F, H, I, L és M csoportok). Ezek valószínűleg konzervált funkciójú, kis evolúciós flexibilitást megengedő fehérjék. Más LRR1 RLK fehérjék az egyik fajban nagymértékben amplifikálódtak, számos paralógot eredményezve, míg a másik két fajban többnyire nem találtunk közeli rokonokat. Mindhárom fajban ki tudtuk mutatni ilyen szelektíven felszaporodó paralógok monofiletikus csoportjait (*A. thaliana*: A és B csoportok; *P. trichocarpa*: C és G csoportok; *M. truncatula*: D csoport; 14. ábra). Az ilyen közeli rokon paralógok biztosíthatják az evolúció nyersanyagát ahhoz, hogy a géncsald negatív szelekciós nyomás alól felszabaduló tagjai új vagy módosult funkciót vehessenek fel.

## Irodalom

Cullimore, J., Denarié, J. (2003) How legumes select their sweet talking symbionts. *Science* **302** (5645): 575-580.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**(6892): 962-968.

Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 275-282.

Kevei, Z., Seres, A., Kereszt, A., Kaló, P., Kiss, P., Tóth, G., Endre, G., Kiss, G.B. (2005) Significant microsynteny with new evolutionary highlights is detected between *Arabidopsis* and legume model plants despite the lack of macrosynteny. *Mol. Genet. Genomics* **274**: 644-657.

Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., Geurts, R. (2005) Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10375-10380.

Vision, T.J., Brown, D.G., Tanksley, S.D. (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* **290**: 2114-2117.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., Shoemaker, R.C. (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* **137**: 1189-1196.

Zhu, H., Riely, B.K., Burns, N.J., Ane, J.M. (2006) Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics* **172**: 2491-2499.