

A szimbiotikus gümő kialakulásában résztvevő két gén azonosítása *Medicago truncatula*-ból térképezésen alapuló génizolálással c. OTKA pályázat (T046645) zárójelentése

A pályázat célja a *Sinorhizobium meliloti* és a *Medicago truncatula* között létrejövő szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolat kialakításában résztvevő két *M. truncatula* gén azonosítása volt térképezésen alapuló génizolálással. A mutánsok szimbiotikus fenotípusa azt valószínűsítette, hogy a mutációt szenvedett gének termékei a szimbiotikus gümő kialakulásának korai szakaszában, a bakteriális jelmolekula (Nod faktor) által elindított szignálútban, illetve a gümő organogenezisben vesznek részt.

A gének azonosítását térképezésen alapuló génizolálással végeztük el, melynek során a mutáns génekhez szorosan kapcsolt genetikai markereket kerestünk, melyek segítségével a nagy inszertméretű genomiális klónokat (BAC klónok) azonosítottunk. Átfedő BAC klónok segítségével a mutáns géneket körülölelő régiókat lefedtük, és a régió szekvenciájának meghatározását követően géneket és feltételezett kódoló szakaszokat kerestünk. A keresett gének azonosítását a gének mutáns és vad típusú növényből meghatározott szekvenciájának összehasonlításával végeztük el. A gének azonosságát komplementációs kísérletekkel (vad fenotípus visszaállítása mutáns növényekben vad típusú szekvenciák bejuttatásával) igazoltuk.

A *DMI1* gén azonosítása

A *DMI1* gén azonosítását kooperációs partnerünkkel (D. Cook, University of California, Davis, USA) együttműködésben végeztük. A *dmi1* mutáns fenotípust a *M. truncatula* kettes kapcsoltságú csoportjára (LG 2) térképeztük a 1N1R és a DK407L markerek közelébe. A térképező populáció egyedszámát több mint 1500-ra növeltük és a szimbiotikus fenotípusuk, valamint a két közeli kapcsolt markerre meghatározott genotípusuk alapján megállapítottuk, hogy a *dmi1* mutáns gén az 1N1R genetikai marker és a kettes kromoszóma telomerikus régiója között helyezkedik el. Ebben a régióban a *M. truncatula* genetikai térkép ekkor még nem tartalmazott további genetikai markereket, ezért a közeli rokon lucerna (*Medicago sativa*) kapcsoltságú térképét (Kaló és mtsai 2000) hívtuk segítségül, tudva, hogy a két *Medicago* genom nagyfokú hasonlóságát mutat (Choi és mtsai. 2004). Az 1N1R és a DK407L genetikai markerek térképhelyzetét meghatároztuk a diploid lucerna genetikai térképén is. A diploid lucerna genetikai térképén az 1N1R marker és a kettes kapcsoltságú csoport (LG2) proximális vége között egy olyan gén alapú marker (U212D) volt, melynek térképhelyzetének meghatározása a *M. truncatula* mutáns szegregáló populáción nem mutatott rekombinációt a mutáns fenotípus és az U212D marker között.

A mutáns fenotípushoz szorosan kapcsolt markerek (1N1R és U212D) segítségével BAC (Bacterial Artificial Chromosome) klónokat azonosítottunk egy másik kooperációs laboratóriummal együttműködésben (CNRS_INRA, Toulouse, France), melyeket részben restriktációs emésztési mintázatuk, valamint a klónok végfragmentjeinek PCR amplifikációs mintázata alapján sorrendbe raktunk és így összeállítottuk a DMII kontigot. A kapott klónok egy kb. 1.2 Mb-nyi genomi szakaszt fedtek le az LG2 proximális végén. A kontigban lévő BAC klónok végszekvenciáinak segítségével további markereket készítettünk, melyek segítségével leszűkítettük a mutációért felelős gén helyzetét. A *DMII* gén a kontigban lévő 57N18S genetikai marker és a kromoszóma vége között helyezkedett el egy 550 kb nagyságú szakaszon.

Az 57N18S marker és a *DMII* gén között a vizsgált 550 kb nagyságú genomi szakaszon egyetlen rekombinációs eseményt tudtunk azonosítani több mint 1500 egyed vizsgálatát követően, azaz a telomér közeli régióban a rekombinációs események számának erőteljes csökkenését tapasztaltuk. Ezért a *DMII* gént tartalmazó szakasz további szűkítése helyett elkezdtük az 550 kb-os genomi szakasz szekvenciájának meghatározását és azoknak a géneknek a keresését, melyek mutációja a fenotípust okozhatta. A DMII régiót lefedő BAC klónok szekvenciájának meghatározását követően számítógépes programok segítségével a régió szekvenciáját összeillesztettük. A régió szekvenciájának analízisével (BlastX és FGENESH) 85 lehetséges gént ill. kódoló szekvenciát azonosítottunk.

Oligonukleotid primereket terveztünk a jelölt génekre és PCR amplifikációt végeztünk a rendelkezésünkre álló három EMS és két neutron besugárzással előállított *dmi1* mutáns allélt hordozó, valamint vad típusú növény genomi DNS és cDNS templátjain. A nagyszámú jelölt gén miatt az amplifikálandó géneket felosztottuk együttműködő partnerünkkel. Egy ismeretlen funkciójú fehérjét kódoló gén amplifikációjának hiánya a két neutron besugárzással előállított allél esetében nagyobb genomi szakasz hiányát jelezte (neutron besugárzás általában kisebb vagy nagyobb genomi szakaszok delécióját eredményezi). Az EMS-es allélok esetében is olyan mutációkat találtunk ennek a génnek szekvenciájában, melyek stop kodont eredményeztek, vagy pedig a mRNS érésében okoztak zavart.

A mutációk alapján azonosított gén cDNS szakaszát egy 1.6 kb nagyságú promóter régióval illesztettük össze, majd a konstrukciót *Agrobacterium rhizogenes* baktérium közvetítésével *dmi1* mutáns növény juttattuk. A transzformáns gyökereken megjelenő gümők megjelenésével igazoltuk, hogy a *DMII* gén azonosságát.

A *DMII* gén teljes hosszágú cDNS szakasz egy 2649 bp hosszúságú nyílt leolvasási keretet tartalmaz, ami egy 883 aminosavból álló fehérjét kódol. A számítógépes homológia vizsgálatok nem mutattak ki semmilyen eddig ismert növényi fehérjével, vagy annak alegységével hasonlóságot, de a feltételezett ortológ szekvenciák rizsben, *Arabidopsis*-ban és több egy- és

kétszikű növényben megtalálhatóak. A domén vizsgálatok négy transzmembrán régiót, valamint egy konzervált domént (DUF1021) azonosítottak. A DUF1021 domén kisebb mértékű, de az egész doménre kiterjedő hasonlóságot mutatott bakteriális kálium csatornák TrkA doménjével, így a DMI1 fehérje feltételezhetően kation csatornaként, vagy annak alegységeként működik. Együttműködő partnerünk további vizsgálatai időközben kimutatták, hogy a DMI1 protein a *M. truncatula* magmembránjában helyezkedik el (Riely et al. 2007).

A DMI1 és DMI2 régió szekvenciájának részletes analízise

A *DMI1* gén genetikai klónozása során egy több mint 500 kb nagyságú genomi régiót azonosítottunk a 2. kromoszóma rövid karján, ahol a gén elhelyezkedhetett. A gén izolálásához szükség volt a régióban lévő kódoló szekvenciák azonosítására. A *DMI1* régió nagy mérete miatt a szekvenálandó BAC klónokat és azok bioinformatikai analízisét felosztottuk együttműködő partnereinkkel.

Az általunk vizsgált 368188 bp hosszúságú genomi szakaszt 3 BAC klón (mth2-54A24, amely a *DMI1* gént tartalmazza, mth2-28O14 és mth2-55E21) fedte le. A közel 370 kb nagyságú szakaszon meghatároztuk a potenciális gének és egyéb jellegzetes szekvencia elemek számát és helyzetét egy FGENESH program segítségével (www.softberry.com). Ezt követően a szekvenciát tovább vizsgáltuk BLAST analízissel az NCBI nem redundáns fehérje (www.ncbi.nlm.nih.gov), az *Arabidopsis thaliana* fehérje (www.arabidopsis.org), és *M. truncatula* EST (www.tigr.org) adatbázisaival szemben. A két programmal végzett vizsgálat 41 gént ill. potenciális kódoló szekvenciát tárt fel. Ez megfelel a korábban más *M. truncatula* genomi vizsgálatok során tapasztalt átlagosan 1 gén/10 kb aránynak. A feltételezett gének között kilenc olyan hipotetikus kódoló szakaszt találtunk, melyhez szekvencia hasonlóság alapján nem tudtunk feltételezett funkciót társítani.

Korábban azonosítottuk a *S. meliloti* és *M. truncatula* között létrejövő szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolat kialakításában résztvevő *DMI2* (*NORK*) gént (Endre és mtsai. 2002). Elvégeztük a *DMI2* gént tartalmazó 276 kb nagyságú genomi régió összehasonlítását egy másik pillangósvirágú növény (*Lotus japonicus*), az *Arabidopsis thaliana* és nyárfa genomok megfelelő régióival (Kevei és mtsai 2005). A vizsgálatok a *NORK* régió jelentős hasonlóságát mutatták a gének sorrendjében és orientációjában.

A PDL gén azonosítása

A *PDL* gént szintén genetikai térképezésen alapuló génizolálással azonosítottuk. A korábbi térképezési adatok alapján a *pdl* gén az LG7 kapcsoltsági csoport alsó régiójában helyezkedett el. A gén klónozásához a mutáns *pdl* és a vad típusú *Medicago truncatula* A20-as ökotípusú

növények keresztezésével létrehoztunk egy közel 2000 növényt tartalmazó F2 térképező populációt. A növények genotípusát meghatároztuk a mutáns lókuszt közrefogó genetikai markerekre (58T, DK427R). A genotípusok alapján kiválogattuk a régióban rekombinációt mutató egyedeket, valamint a *pdl* fenotípusú növényeket, és ezekkel elvégeztük a szimbiotikus növényi tesztet. A szimbiotikus fenotípusok meghatározását követően 492 mutáns egyedet azonosítottunk, melyekből 13 mutatott rekombinációt a két határoló marker között. A rekombinációs gyakoriság alapján meghatározott genetikai távolság szerint a mutáns gén és a közrefogó 58T és DK427R markerek annyira közeliek voltak, hogy célravezetőnek gondoltuk a meglévő kapcsolt markerek segítségével BAC klónok azonosítását és megkísérelni a PDL régiót lefedő klónsorozat összerakását.

A mutáns géntől mindössze 0.3 cM távolságra elhelyezkedő DK427R marker segítségével négy, egymással átfedő BAC klónt azonosítottunk, melyek tartalmazták a DK427R markert. A *Medicago* BAC klónokat a restriktions emésztési mintázatuk alapján a genom szekvenálási program keretében csoportosították (az átfedő klónok ún. kontigokat alkotnak), melyből egy az interneten elérhető adatbázist hoztak létre (www.medicago.org/genome/). Az általunk azonosított négy klón egy olyan kontigban (PDL kontig) helyezkedett el, amely közel ötven BAC klónt tartalmazott, köztük egy ismert szekvenciájú klónt is. A kontig klónjai közül számosnak meghatároztuk végszekvenciáját, és az így rendelkezésünkre álló BAC klón ill. BAC végszekvenciák segítségével genetikai markereket állítottunk elő. Ezek közül a TC87156_1 és TC80512_1 markerek a *PDL* gén két oldalán helyezkedtek el (egy ill. két rekombinációt azonosítottunk a markerek és a *PDL* gén között), egy harmadik genetikai marker (29P9F) pedig teljes mértékben együtt szegregált a *pdl* fenotípussal. A markerek segítségével tehát tovább szűkítettük azt a genomi szakaszt, ahol a *PDL* gén elhelyezkedhet.

Ezt követően meghatároztuk a TC87156_1 és TC80512_1 markerek közötti kb. 50 kb nagyságú genomi régió szekvenciáját. A kapott szekvencia analízisét BLASTX és BLASTN számítógépes programok segítségével végeztük el az NCBI fehérje, illetve a TIGR *Medicago* kódoló szekvencia adatbázisával szemben. A vizsgálat hat feltételezett gént azonosított a régióban, melyek egy ismeretlen funkciójú fehérjét, egy alfa tubulint, egy ERF (AP2) típusú transzkripciós faktort, egy RNS-kötő fehérjét, egy exosztozin-szerű fehérjét, valamint egy Ser/Thr protein kinázt kódolhatnak.

Annak eldöntésére, hogy a hat feltételezett gén közül melyik lehet felelős a *pdl* fenotípusért, meghatároztuk a PDL régióban található hat gén szekvenciáját a *pdl* mutánsból. A gének *pdl* allél szekvenciájának vad típusú szekvenciákkal történő összehasonlítása egyetlen egy génben, az ERF típusú transzkripciós faktor génjében mutatott egy bázispár különbséget. A mutáció egy guanin-adenin csere volt a gén 122. bázispárjában, ami egy glicin-aszparaginsav cserét eredményezett.

Az aminosavcsere a fehérje AP2 doménjének ún. YRG konzervatív motívumában következett be, és az eddig vizsgált 147 *Arabidopsis* AP2-szerű gén ebben a pozícióban tartalmazta ezt a konzervált glicint. Feltételezhetően a fehérje normális működéséhez ebben a pozícióban a glicin jelenléte elengedhetetlen. A gén azonosságának bizonyítására genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk, azonban többszöri próbálkozásunk ellenére sem sikerült a mutáns fenotípust vad típusúvá alakítanunk a mutáns növényben az ERF típusú transzkripciós faktort kódoló gén bejuttatásával.

A kromoszómaséta során tudomásunkra jutott, hogy egy angliai laboratóriumban (Giles Oldroyd, John Innes Centre, Norwich) azonosítottak egy Nod- mutáns lókuszt, amely a *M. truncatula* hetes kapcsoltsági csoportjának a *pdl* lókusszal azonos régiójába térképeződött. Korábban nem vetődött fel a két mutáns azonossága kissé eltérő fenotípusuk miatt. Az angol csoport által vizsgált neutron besugárzással indukált mutáns esetében ugyanis a keletkező infekciós fonalak nem minden esetben abortálódnak, hanem elágazó struktúrákat hoznak létre, innen a mutáns elnevezése: *bit1* -branched infection thread. Ezzel szemben a *pdl* mutáns esetében az infekciós fonalak fejlődése minden esetben elakadt az infekciós hely közelében. A *bit1* mutáns esetében gyakran volt megfigyelhető a kortikális sejtsztódás, míg a *pdl* esetében gümő primordium képződés nem volt megfigyelhető. A *bit1* gyökérszőrök fenotípusa a vad fenotípusú növényekére hasonlít, míg a *pdl* növények a gyökérszőrök jellegzetes csoportosulását mutatják. A mutánsok Nod- fenotípusa és azonos térképpozíciója miatt azonban érdemesnek ítéltük tesztelni a *bit1* és *pdl* allélikus viszonyát. A két mutánst összekereszteltük, és megvizsgáltuk a kapott F1 hibridek szimbiotikus fenotípusát *Sinorhizobium meliloti* fertőzést követően. A *bit1xpdl* keresztezés eredményeként kapott növények egyike sem képzett gümőt rhizóbium fertőzést követően, ami jelezte, hogy a két mutáns ugyanabban a génben szenvedett mutációt. Kooperációs partnerünk időközben azonosította a *bit1* mutánsban a fenotípusért felelős deléció. A több mint 40 kb méretű deléció több gént is érintett, köztük az ERF típusú transzkripciós faktort kódoló gént is. Az általunk elkészített konstrukciók (az ERF típusú transzkripciós faktort kódoló gén különböző transzformációs vektorba klónozva) felhasználásával komplementációs kísérleteket végeztek és igazolni tudták a *BIT1* gén azonosságát. Mivel az allélesztet bebizonyította, hogy a *pdl* és *bit1* mutánsban ugyanaz a gén romlott el, így igazolni tudtuk, hogy a *pdl* fenotípus kialakításáért valóban az ERF típusú transzkripciós faktort kódoló gén mutációja felelős. A gént *ERN*-nek (*ERF* Required for Nodulation) neveztük el. A *pdl* mutáns genetikai komplementációja együttműködő partnerünknek sem sikerült, míg a *bit1* mutánst laboratóriumunkban mi is tudtuk komplementálni. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a *pdl* mutáns valamilyen tulajdonsága okozza a komplementációs kísérletek kudarcát. Feltételezhetően a *pdl* mutánsban (ami nem null

mutáns a *bit1* mutánsnal szemben) keletkező mutáns fehérje valamilyen módon akadályozza a bejuttatott vad típusú gén normális működését.

Kísérleteink során tehát azonosítottuk a *Shinorhizobium meliloti* és *Medicago truncatula* között létrejövő szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolat kialakításában résztvevő *DMII* és *PDL* géneket térképezésen alapuló génizolálással kooperációs partnereinkkel együttműködésben. Az eredményeket nemzetközi tudományos folyóiratokban publikáltuk (Ane et al. 2004, Kevei et al. 2005, Middleton et al. 2007).

- Ané, JM, Kiss, GB, Riely, BK, Penmetsa, RV, Oldroyd, GED, Ayax, C, Lévy, J, Debellé, F, Baek, JM, Kaló, P, Rosenberg, C, Roe, BA, Long, SR, Dénarié, J, Cook, DR (2004) *Medicago truncatula* *DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303:1364-1367.
- Choi, HK, Kim, D, Uhm, T, Limpens, E, Lim, H, Mun, JH, Kaló, P, Penmetsa, RV, Seres, A, Kulikova, O, Roe, BA, Bisseling, T, Kiss, GB, Cook, DR (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker co-linearity with *Medicago sativa*. *Genetics* 166:1463-1502.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417 : 962 2002
- Kaló, P, Endre, G, Zimányi, L, G Csanádi and Kiss, GB (2000) Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor. Appl. Genet* 100:641-657.
- Kevei Z, Seres A, Kereszt A, Kaló P, Kiss P, Toth G, Endre G, Kiss GB (2005) Significant microsynteny with new evolutionary highlights is detected between Arabidopsis and legume model plants despite the lack of macrosynteny. *Mol Genet Gen* 274: 644–657
- Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kaló P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, VandenBosch K, Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GED (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19:1221-1234
- Riely, BK, Lougnon, G, Ane, JM, Cook, DR (2007) The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant Journal* 49:208-216