

Zárójelentés

Egy specializált növényi szerv, a szimbiotikus gyökérgümő kialakulásához kapcsolódó folyamatok funkcionális genomikai vizsgálata

OTKA T 046819 2004-2007

A pályázaton belül elsősorban egy új szimbiotikus *Medicago* génnek (*Lin*) a mutáns fenotípus térképezésén alapuló klónozását és elsődleges leírását vállaltuk. A *Medicago truncatula lin* mutáns („lumpy infection”) nevét szimbiotikus fenotípusa, a gümőprimordiumok által „göröngyössé” tett gyökér alapján kapta. Ezen növények gyökerén vad típusú szimbionta baktérium adásakor a kezdeti növényi válaszreakciók indukálódnak, és a sejtosztódás következtében a gümőprimordium kialakul a belső kéregsejtekből. A baktériumok bejutnak a gyökérszörbe, az infekciós fonál kialakul, azonban a baktériumok nem tudnak továbbmenni, az infekció elhal a gyökér epidermiszben. A mutációt szenvedett génnek tehát elengedhetetlen funkciója van a gyökérgümő kialakulásában. Ezt a **vállalt feladatot teljes egészében teljesítettük**. Az azonosított gén egy olyan fehérjét kódol, melynek feltételezett funkciója egy, a szimbiózis kialakulásában még nem vizsgált útnak, az ubiquitinációs folyamatoknak a fontosságára mutat rá. Ezen munka részletesebb ismertetését adjuk, mivel az erről szóló közlemény még csak kézirat formájában van meg, nemzetközi folyóiratba küldés előtt. Emellett a gyökérgümő kialakulásához elengedhetetlen *Medicago* gén, az elsőként azonosított NORK további vizsgálatát folytattuk: az eredeti tetraploid mutáns lucerna növényben elvégeztük a vad típusú alléllal a komplementációt, valamint részt vettünk egy a NORK fehérjével kölcsönhatást kialakító fehérje azonosításában, melyről kimutattuk, hogy szintén fontos szerepe van a szimbiózis folyamatában. Mind a *Lin* gén genetikai és fizikai térképezésekor, mind a NORK régió elemzésekor, genomikai összehasonlításokból olyan érdekes új eredmények születtek, melyek publikációra érdemesek voltak. Ezeket az eredményeket, melyekből megjelent közlemények vannak, a jelentés végén röviden összefoglaljuk.

A *lin* mutáns genetikai térképezése

A *Medicago truncatula lin* mutáns keresztezése már korábban megtörtént az A20 jelű növényvel. A hibrid F1 egyedekről magokat gyűjtöttünk és az első 123 egyedből álló F2 szegregáló populáción több markernek is meghatároztuk a genotípusát. A genotípusok kiértékelése után a *lin* mutációt az egyes kapcsoltsági csoportra tudtuk térképezni, a DSI és SCP markerek közé. E két marker még több mint 7 cM genetikai távolságot fed le, tehát további, szorosabb kapcsoltságban lévő molekuláris markereket keresünk még a fizikai térképezés előtt,

ez volt az első év egyik feladata. Később a terveknek megfelelően újabb F2 egyedeket neveltünk fel a *lin* szegregáló populáció kiterjesztéséhez. Meghatároztuk a felnövesztett 180 új egyed szimbiotikus fenotípusát, majd mindegyikből genomi DNS-t tisztítottunk. Elvégeztük ezen új egyedek genotipizálását a két határoló markerre, a DSI és SCP markerekre, és ezáltal a vizsgált régióban 16 új rekombinációs eseményt hordozó egyedeket sikerült azonosítani, melyeknek a későbbi finom térképezés során vettük hasznát.

A DSI és SCP molekuláris markerekkel behatárolt régió további genetikai térképezéséhez először a diploid lucerna (*Medicago sativa*) térképen általunk korábban azonosított markereket elemeztük térkép összehasonlítás segítségével. A specifikus primerekkel sikerült amplifikálni a *M. truncatula* DSI markernek megfelelő szekvenciákat a *M. sativa* szegregáló populáción, majd meghatározzuk e marker térképhelyzetét a *M. sativa* egyes kapcsoltsági csoportján. Ebben a régióban a *M. sativa* térképen négy olyan DNS markert találtunk, melyek gén alapúak és szekvenciájuk ismert volt (U212B, U163, U85, U181), tehát lehetőségünk adódott olyan primereket tervezni, amelyekkel a *M. truncatula* egyedeken is tudjuk az adott DNS szakaszt amplifikálni. A négy marker közül kettőt sikerült a *M. truncatula* populáción betérképezni (a másik kettő nem volt polimorf), ám ezekről kiderült, hogy nem mutattak nagyobb kapcsoltságot a *lin* mutációval, mint a korábbi határoló markerek, tehát nem jutottunk közelebb a génhez. Ezzel a munkával párhuzamosan RAPD markereket kerestünk az adott régióba az *M. truncatula* egyedeken. Az ún. Bulked Segregant Analysis módszert alkalmaztuk, vagyis a szegregáló populáció ellentétes homozigóta egyedeit reprezentáló DNS-egyvelegeket teszteltük RAPD primerekkel PCR-ben. Bár kaptunk néhány jó jelöltnek tűnő amplifikációs terméket, azonban a reakciók nem bizonyultak megbízhatónak és ismételhetőnek, feltehetőleg a templát DNS-ek töredékezettsége miatt (ez a jelenség általában nem befolyásolja a specifikus primerekkel végzett és nem nagy méretű fragmentet eredményező PCR amplifikációt, de egyértelműen negatív hatása van az érzékenyebb RAPD PCR-re).

Mіндеzen munkák közben egy francia laboratórium kutatóival való megbeszélés alapján feltételezhetőnek tűnt, hogy a *lin* mutáns talán az *MtN6* jelű génben lehet hibás. Egyrészt az *MtN6* gén kifejeződése specifikusan a szimbiózis kialakulásának abban a szakaszában nő meg, amelyben a *lin* mutánsban a szimbiózis leáll, másrészt a franciák által előállított térképező *M. truncatula* populáción az *MtN6* gén szintén az egyes kapcsoltsági csoportra térképeződött, de a közös molekuláris markerek hiányában egyelőre nem lehetett tudni, hogy mennyire lehet közel a *lin* mutációhoz. A kérdés megválaszolásához elvégeztük az *MtN6* gén térképezését a *lin* mutációt szegregáló populációban, és egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a *lin* nem egyezik meg a *MtN6* génnel, hiszen azzal csak igen kis fokú kapcsoltságot mutat, a köztük lévő genetikai távolság

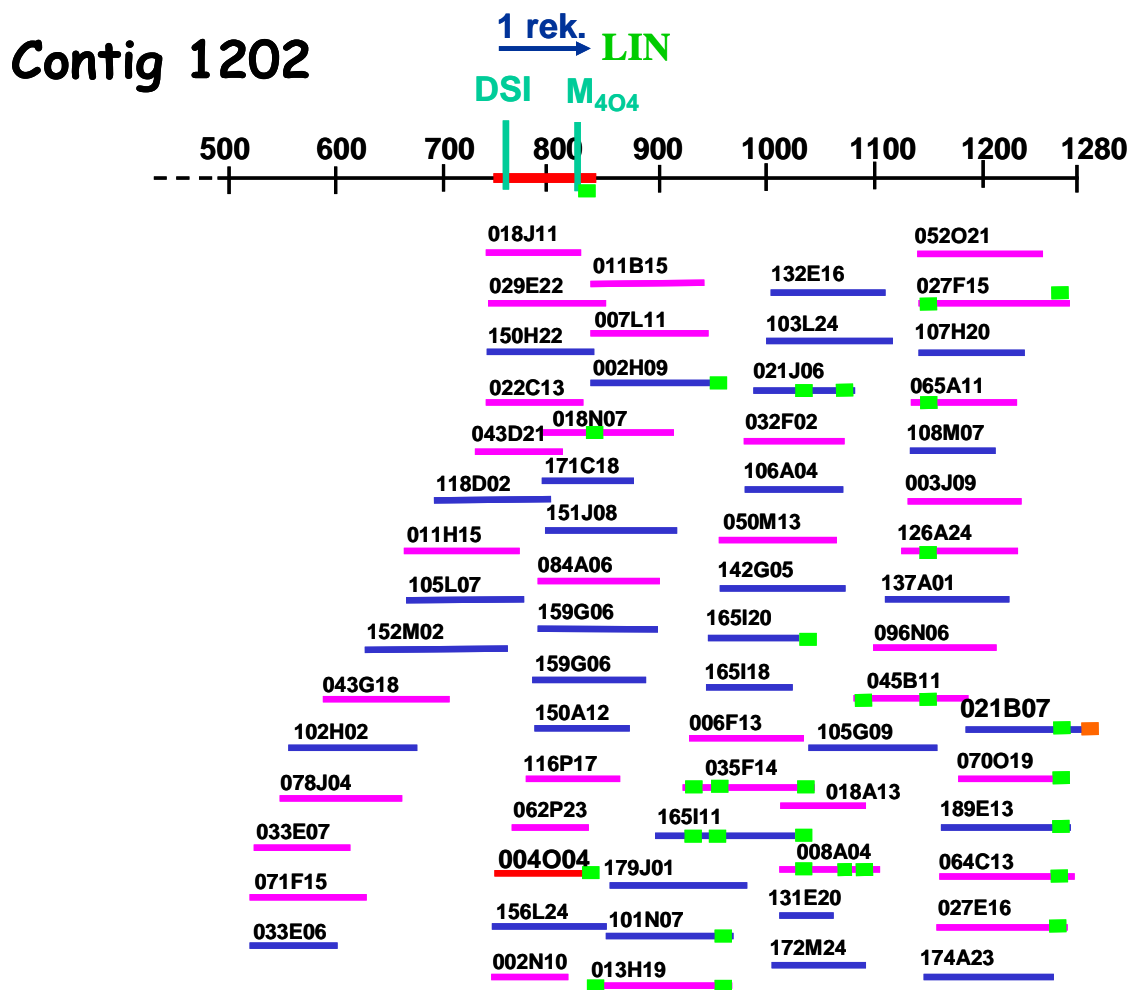
biztosan nagyobb mint 10 cM. Ezzel tehát nem jutottunk még közelebb a *lin* mutációhoz, ugyanakkor a nemzetközi *Medicago truncatula* genomprogram előrehaladásának köszönhetően egyre növekvő *M. truncatula* fizikai térkép információ és szekvencia állt rendelkezésre, melyet már elegendőnek ítéltünk ahhoz, hogy ezek segítségével közelíthessük meg a *Lin*-t az azonosított DSI és SCP molekuláris markerekről kiindulva.

A *lin* mutáns fizikai térképezése

A DSI marker szekvenciáját teljes egészében megtaláltuk az mth2-004004 jelű megszekvenált BAC-on, amely a BAC fingerprint-ből összeállított genomi kontigok közül a ctg1202 sz. kontig része. Mivel a DSI szekvenciája közel volt a BAC klón egyik végéhez, primereket terveztünk a BAC klón ellentétes végére. Ezen primerekkel kapott amplifikált fragmentek agaróz gélen történő elválasztással polimorfizmust mutattak a *M. truncatula* szegregáló populáción, és így genotipizálni tudtuk az egyedeket. A rekombináns egyedek elemzésével kiderült, hogy egy rekombinációval közelebb jutottunk a *lin* mutációhoz, tehát megvan az orientáció, hogy merre menjünk tovább (**1. ábra**). A ctg1202 kontigon (az egyszerűség kedvéért Kontig L1, jelezve a balról indult genomséta első kontigját) ~ 5 átfedő BAC klón segítségével jutottunk el a kontig végéig, ahol a szélső, mth2-021B07 BAC végét használva hibridizációs próbaként két újabb BAC klónt sikerült azonosítani. Ezen BAC klónok fizikai kontigjának (Kontig L2) ellenőrzésekor egy furcsa kép rajzolódott ki: ez a két klón egy prediktált kontig közepére esett úgy, hogy az adatbázisban közölt visszatérképezési eredmények szerint a kontig két vége két eltérő pozícióba térképeződött, tehát nagy odafigyeléssel kellett utánajárnunk, hogy a valós fizikai szakasz merre folytatódik. BAC klón valós átfedések bizonyításából és BAC-vég szekvenciák elemzéséből kiderítettük, hogy ezen a kontigon csak ~ 2 BAC klón hosszúságú szakasz a valódi kapcsolt genomi rész az általunk vizsgált régióban. Ezen rész BAC végeiről származó BAC-vég szekvenciák segítségével meg tudtuk határozni a továbbvivő utat, melyet specifikusan tervezett primerek és PCR segítségével is megerősítettünk. Így jutottunk el a következő kontighoz (Kontig L3), melyről 3 BAC klónnal is kimutattuk specifikus PCR-rel a direkt átfedést. Ezen a kontigon számos további jelölt átfedő BAC klónokat jeleztek, melyek jelenlétét sok esetben meg tudtuk erősíteni, viszont körültekintő, aprólékos munkára volt szükség ahhoz, hogy a valós átfedési kapcsolatokat megrajzolhassuk, ami meglehetősen eltért az előzetes kontig rajzolatától. Végül sikerült a pontos régiót összeilleszteni a BAC inszertekből (~ 4 BAC klón hosszúságú), és azonosítottuk a legtovább elérő BAC klónt is.

1. ábra: A DSI markert hordozó BAC klón és fizikai kontigja egy részletének képe.

A színes vízszintes vonalak egyedi BAC klónok a régióban, rajtuk a rövid élénk zöld jelek a tervezett PCR primer helyek genetikai markerek előállításához. Az ábra tetején húzódó hosszú fekete egyenes a fizikai távolságot jelzi kilobázisban. A genetikai térképezés eredményeként meghatározott M_{404} marker pozíciója megmutatta, hogy mely irányba kell folytatnunk a genomsétát a *Lin* gén felé.



Mindezen genomséta alatt, miközben a BAC klónok közti valós átfedéseket kerestük, ill. igazoltuk is, folyamatosan próbáltunk több primerpárral genetikai térképezésre alkalmas, polimorfizmust mutató markereket is előállítani a mutáció pontosabb térképezésére. A leírt fizikai út során (Kontig L1 – L2 – L3) 8 különböző ponton sikerült genetikai markert előállítanunk, melyek genotípusát meghatároztuk a szegregáló populáció rekombináns egyedein. Sikerült megrajzolnunk ezáltal a rekombinációs „lépcsők” helyzetét is, és nyomon követhettük,

ahogy lépésről-lépésre (rekombinációról-rekombinációra) közelebb kerültünk a *lin* mutációhoz, egészen addig, hogy a Kontig L3 legszélén lévő genetikai marker már rekombináció nélkül, a legszorosabb kapcsoltságot mutatja a *lin*-nel. Érdekessége ennek a képnek még, hogy láthattuk a rekombinációk véletlenszerű elhelyezkedéseit, hiszen volt olyan, hogy egy BAC klónon belül átugrottunk egy rekombinációt, míg az is előfordult, hogy több BAC klónon átívelő, majd egy megabázisnyi részen nem volt rekombinációs esemény.

A genetikai térképezéssel a mutáció másik oldaláról kiindulva, az SCP markerhez az mth2-008F09 jelű BAC klónt adták meg, mint az SCP szekvenciát hordozó klónt. Azonban amikor ennek a BAC klónnak egy másik részére terveztünk primereket, és a kapott markert genotipizáltuk a *lin* populáción kiderült, hogy semmiféle kapcsoltságot nem mutat a *lin*-nel. Tüzetesebb szekvencia elemzéssel kiderítettük, hogy bár egy SCP-homológ szekvencia valóban jelen van a mth2-008F09 BAC klónon, ez mégsem 100%-ban homológ vele. A teljes homológiát mutató SCP szekvenciát az mth2-013L02 BAC klónon sikerült azonosítani, amely a ctg 1182 kontigba van sorolva (az egyszerűség kedvéért Kontig R1, jelezve a jobbról indult genomséta első kontigját). Ebben a kontigban is elvégeztük a markerek előállításához szükséges munkálatokat, az átfedő BAC klón szekvenciák alapján primer tervezéseket PCR amplifikációkhoz, a BAC-ok helyzetének igazolására és a *lin* szegregáló populáción történő visszatérképezéshez. Meghatároztuk a genomséta irányát és eljutottunk a Kontig R1 végén lévő klón végéig, mely fragmenttel hibridizációval két újabb átfedő, de egyedi BAC klónt azonosítottunk, melyeknek nem volt kontig „hovatartozásuk”. Ezek további elemzése előtt szintén az egyre növekvő *Medicago* adatbázisban újabb, a régióba térképeződő, BAC szekvencián alapuló genetikai markerek jelentek meg, melyekről a *lin* szegregáló populáció egyedein történt genotipizálással bebizonyítottuk, hogy közelebb esnek a *lin* mutációhoz, mégpedig erről a fizikai útról közelítve. Így mindjárt a Kontig R2 és annak BAC-jaira „ugrottunk” (~ 5 BAC klón hosszú), és a szokásos ellenőrzések után mentünk tovább a Kontig R3 (~ 4 BAC klón hosszú), majd Kontig R4 (~ másfél BAC klón hosszú) kontigokra. Mindvégig a már leírt BAC-vég szekvencia információk részletekbe menő elemzésével (homológia keresések, különböző BLAST analízisek), és fizikai (PCR, hibridizáció) megerősítésekkel bizonyítottuk a BAC klónok valós átfedését és rajzoltuk meg a fizika térképet. Erről az oldalról az út során (Kontig R1 – R2 – R3 – R4) 12 genetikai markert sikerült előállítanunk, és 2 rekombinációra megközelítanünk a *lin* mutációt.

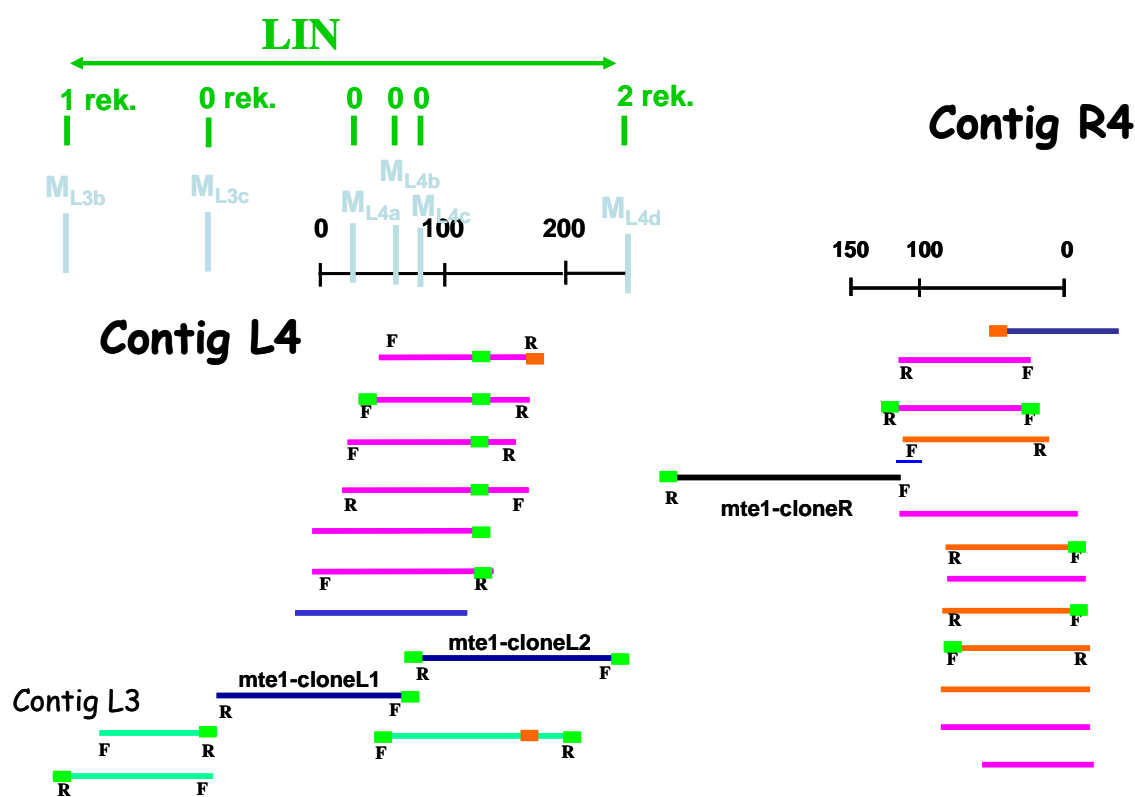
A *lin* régió behatárolása, szekvenálása, annotálása:

A két oldalról indított és vezetett genomséta eredményeként tehát megközelítettük *lin* mutációt, azonban még nem ért össze a két szakasz, nem volt kezünkben a teljes régió. Eljutottunk egyik oldalról, a Kontig L3 révén egy olyan BAC klónig, mely rekombináció nélkül, 100% kapcsoltságot mutatott a *lin*-hez a szegregáló populációban; a másik oldalról, a Kontig R4 révén pedig egy olyan BAC klónig, mely két rekombináció távolságra volt még a *lin* mutációtól. Ezen a ponton azonban nem sikerült olyan *Hind*III enzimmal készült BAC klónt, ill. kontigot azonosítani, amellyel átfedést lehetett volna kimutatni, és a két végpontot össze tudtuk volna zárni egy folytonos szakasszá. Ugyanakkor sikerült olyan, *Eco*RI restrikciós emésztéssel készült BAC klón jelölteket azonosítani szekvencia homológia alapján, melyekről csak BAC-vég szekvencia információ állt rendelkezésre. Ezek a klónok egy francia laboratóriumban készültek és nem vettek részt a korábbi kontigok felépítésében, ugyanakkor el tudtuk kérni ezeket, és ellenőrizni tudtuk, hogy valós átfedést és a régió további szakaszát reprezentálják-e. Az egyik oldalról, a Kontig L3 felől így valóban egy *Eco*RI BAC segítségével továbbjutottunk, melynek révén egyrészt egy újabb kontigot azonosítottunk (Kontig L4), majd legtávolabb ismét egy újabb *Eco*RI BAC klónnal jutottunk el (2. ábra). Genetikai markerek előállításával, és ezeknek a rekombináns egyedeken végzett genotipizálásával meghatároztuk azt a genomi szakaszt, melyen belül a markerek 100%-ban kapcsolnak a *lin* mutációval, hiszen a felépített régió legtávolabbi pontjának genotipizálásakor kiderült, hogy itt már „átugrottuk” a „maradék” két rekombinációs eseményt is, mellyel eljutottunk addig a rekombinációs pontig, ahova a genomséta másik oldaláról, a Kontig R4 felől közelítve is megérkeztünk.

Összegezve tehát, a fizikai térképezés, genomséta nyomán meghatároztuk azt a ~ 350 - 400 kb hosszúságú genomi DNS szakaszt, mely a *lin* mutációt hordozó gént tartalmazza. A régiót reprezentáló BAC klónok szekvenálását a nemzetközi Medicago genomprogramon belül az 1. kromoszómát szekvenáló amerikai laboratórium segítségével sikerült meghatározni. A nyers DNS szekvencia elemzésekor egyrészt különböző génpredikciós programokat, másrészt adatbankokban rendelkezésre álló EST szekvenciákat használtunk a régió kódoló szakaszainak azonosítására.

2. ábra: A betérképezett *lin* mutációt hordozó *Medicago* régió fizikai és genetikai térképe.

A kétoldalról közelítő genomséta eredményeként kapott fizikai szakaszok a kontig R4 és kontig L4 felől. A színes vízszintes vonalak egyedi BAC klónok a régióban, rajtuk a rövid élénk zöld jelek a tervezett PCR primer helyek genetikai markerek előállításához. Sötétkéssel jelöltük azokat a BAC klónokat, melyeket a téma keretén belül szekvenáltunk meg. Az ábra tetején húzódó hosszú zöld nyíllal tüntettük fel a genetikai térképezés eredményeként meghatározott, a *Lin* gént hordozó régiót (0 rek., vagyis rekombináció nélkül, szorosan kapcsolta a *lin* fenotípussal), melyet az azonosított rekombinációk (1 rek., ill. 2 rek. a szakasz két végén) határolnak.

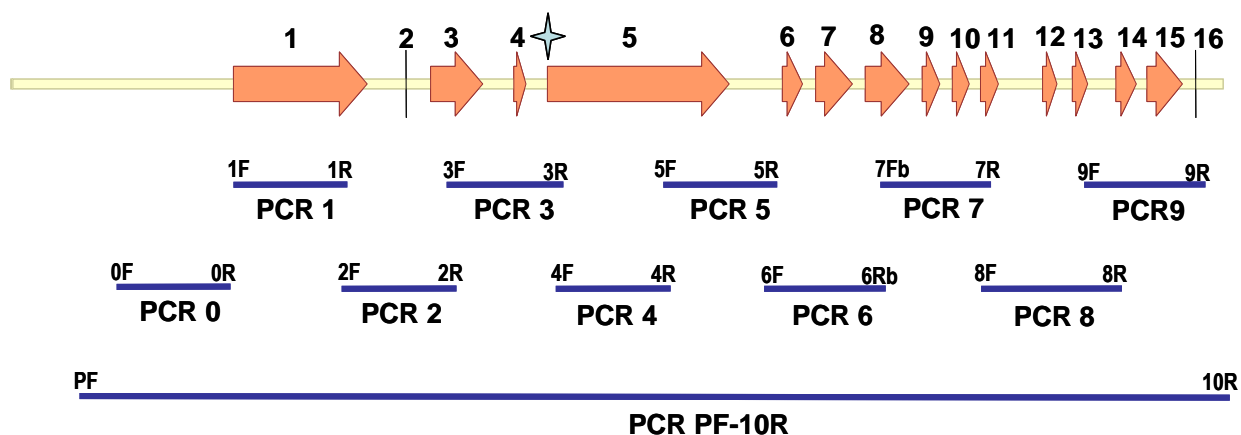


A kapott gének listájából kiválogattuk azokat, melyek jó jelölteknek látszottak a *Lin* funkció betöltésére. Ezeket egyrészt szekvencia homológián alapuló feltételezett funkció alapján (pl. különböző transzkripció faktorok, receptor kináz), másrészt ismeretlen funkciójú, de az EST adatok alapján elsősorban szimbiotikus szövetekben kifejeződő gének közül szelektáltuk. Ezekre a kódoló szekvenciákra primerpárokat terveztünk, és a teljes gént átfedő fragmentek formájában amplifikáltuk a *lin* mutáns egyedből, majd klónoztuk és szekvenáltuk azokat.

Az összeillesztett szekvencia alapján láthattuk, hogy vajon az adott génben a *lin* mutáns hordoz-e mutációt. Az általunk legjobb jelöltnek ítélt, sorrendbe állított első nyolc gén egyikében sem találtunk mutációt. A kilencedikként megszekvenált, 16 exonból álló génben azonban végre sikerült azonosítani egy pontmutációt. Ez a mutáció, bár egy intronban volt, azonban annak utolsó, exon melletti pozíciójában (3. ábra), ezért tovább vizsgáltuk a génről átíródó cDNS szekvenciákat.

3. ábra: Az azonosított *Medicago Lin* gén sematikus ábrája.

A vastag nyilak az exonokat jelzik a genomi DNS-en, csillaggal jelöltük a mutáció helyét a vizsgált mutánsban. Kék vonalak jelzik az átfedő PCR termékeket, melyeket a klónozásokhoz és szekvenáláshoz készítettünk.



Mivel erről a génről az adatbankokban, a megszekvenált több mint 200 000 *Medicago* EST között egyetlen kifejeződő szekvenciát sem találtunk, először a vad típusú *Medicago* növény egy szimbiotikus szövetéből (gyökér 4 nappal a rhizobiális inokuláció után) tisztított RNS-ből készített cDNS templáton próbáltuk amplifikálni a gént. A sikeres amplifikációk klónozása és szekvenálása révén összeállt a vad típusú *Lin* cDNS szekvenciája. Ekkor a mutáns egyedből készített cDNS templáton is elvégeztük a kísérletet, és bebizonyosodott, hogy a mutáció helyénél az érintett intron az mRNA érése során nem képes kivágódni a kódoló szekvenciából, és mivel az intronon belül egy korai STOP kodon lesz így jelen a transzkriptumban, a transláció során már csak egy csonka, rövid fehérje képződhet.

Elvégeztük a mutáns növény komplementációját is. Amplifikáltuk a teljes hosszúságú, vad típusú cDNS-t, majd klónoztuk először ún. „entry” vektorba, onnan pedig növényi transzformációra alkalmas vektorba. Mivel a növények gyökerein látszódnó fenotípusú mutáció komplementálásáról volt szó, alkalmazhattuk az *Agrobacterium rhizogenes* által kiváltott ún.

„hairy root” transzformációs rendszert. A mutáns növényeken létrehozott transzgenikus gyökereket vad típusú *Rhizobium meliloti* baktériumokkal inokuláltuk, és figyeltük a kialakuló szimbiotikus gümőket. Ellentétben a mutáns gyökéren megjelenő apró, baktériumoktól mentes gümőkezdeményekkel, ezeken a transzgenikus gyökereken a vad típusú növényen kialakulóhoz hasonló, baktériumokkal teli gümőket találtunk. Ezzel bizonyítottuk, hogy a genetikai és fizikai térképezésen alapuló génizolálással azonosított *Lin* gén valóban a mutációt szenvedett, keresett gén.

Az azonosított gén egy hosszú, ~ 1500 aminosavból álló fehérjét kódol, mely feltételezett funkcióját különböző homológia keresésekkel, domén azonosítással próbáltuk prediktálni. A hosszú fehérjében egyetlen egyértelmű funkcionális domént, az ún. U-box domént lehetett azonosítani, más, kisebb homológiájú doménpredikciók mellett. Az U-box domének általában E3 ubiquitin ligázok funkcionális egységei, melyek katalizálják egy szubsztrát fehérje mono- vagy poliubiquitinációját, mely legtöbbször az adott fehérje degradációjához vezet. Elsősorban a már megszekvenált genomok elemzése alapján elmondható, hogy növényekben számos U-box domént hordozó potenciális E3 ubiquitin ligázt kódoló gén van, azonban a *Medicago Lin* fehérje doménszerkezete egyedinek mondható, a legközelebbi *Arabidopsis* szekvenciáknál főleg az N-terminális részen egyáltalán nem követhető nyomon homológia. További keresések a közelebbi rokon nyárfában már teljesebb homológiát mutató fehérjék génjeit azonosították. A szimbiotikus gümő kialakulásának folyamatában eddig nem tűnt fel az ubiquitinációs út egyik eleme sem, pedig ez egy olyan szabályozó út, melynek logikusan lehet szerepe ennek az új növényi szervnek a kialakulásában, funkcionálásában. A *Lin* mutációja az első bizonyíték, hogy bizonyos elemek specializálódhattak erre a folyamatra, pontos működésük elengedhetetlen, s ezek további vizsgálata a szabályozás újabb oldalait tárhatják fel, melyet egy következő OTKA pályázat keretében szeretnénk megismerni.

Ahogy a bevezetőben említettük, a részletesen leírt munka legfőbb eredményéről a kézirat készítés alatt, beküldés előtt áll. A pályázat során elvégzett munka bizonyos részletei, illetve a szimbiotikus gümő kialakulásához szükséges folyamatokban résztvevő más molekulák jellemzésében végzett munkáink már megjelentek publikációk formájában.

Megjelent egy, a *lin* mutáns jellemzését és elsődleges térképezését bemutató cikk: Kuppasamy KT, **Endre G**, Prabhu R, Penmetsa RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R, VandenBosch KA *LIN*, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol.* 136:3682–3691 (2004)

A fentiekben vázolt fizikai genomséták nemcsak a *lin* génhez vezettek minket közelebb, de fontos új információk birtokába kerültünk bizonyos kontigok összetételével, BAC klónok viszonyával kapcsolatban, ill. új átfedéseket határoztunk meg egymással korábban még nem összekapcsolt kontigok tekintetében. Ezen információk segítik a nemzetközi összefogású *Medicago* szekvenálási genomprogramot is, melynek keretében egy tudományos közlemény is megjelent: Mun JH, Kim DJ, Choi HK, Gish J, Debelle F, Mudge J, Denny R, **Endre G**, Saurat O, Dudez AM, Kiss GB, Roe B, Young ND, Cook DR Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: A resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics* 172: 2541-2555 (2006).

A genomsétával azonosított régiók szekvenciái alkalmasak ugyanakkor bizonyos fajok közötti térképösszehasonlítási munkálatokra is. A leírt munkával párhuzamosan részt vettünk egy hasonló megközelítésű, makro- és mikroszinténikus genomi összehasonlításban is: Kevei Z, Seres A, **Kereszt A**, Kaló P, Kiss P, Tóth G, **Endre G**, Kiss GB Significant microsynteny with new evolutionary highlights is detected between *Arabidopsis* and legume model plants despite the lack of macrosynteny. *Mol. Gen. Genomics* 274:644-57 (2005).

A szimbiotikus gümő kialakulásának egyik elengedhetetlen szereplője a NORK fehérje, melyet korábban elsőként azonosítottunk. Az eredeti tetraploid lucerna mutáns komplementációja nem volt egyszerű, nem lévén alkalmas sem az *Agrobacterium rhizogenes* „hairy root” transzformációra, sem az *Agrobacterium tumefaciens* mediálta transzformációra. Egy, a szomatikus embriogenezisre képes lucerna vonallal történő keresztezése, majd többlépcsős szelekciók és transzformáció révén sikerült bizonyítanunk az eredeti lucerna *nork* mutáció komplementálását is: Perhald A, **Endre G**, Kevei Z, Kiss GB, **Kereszt A** Strategies to obtain stable transgenic plants from non-embryogenic lines: Complementation of the *nn1* mutation of the *NORK* gene in *Medicago sativa* MN1008. *Plant Cell Rep.* 25: 799-806 (2006)

Szintén a NORK fehérjével kapcsolatban sikerült azonosítani egy vele kölcsönhatásba lépő molekulát (MtHMGR1). A kísérletek bebizonyították, hogy ez az interakció specifikus, és az *MtHMGR1* gén csendesítése szintén szimbiotikus fenotípushoz vezet, tehát ismét sikerült a gümő kialakulásához vezető szignáltranszdukciós út egy újabb elemét azonosítani: Kevei Z, Loughon G, Mergaert P, Horváth GV, **Kereszt A**, Jayaraman D, Zaman N, Marcel F, Regulski K, Kiss GB, Kondorosi A, **Endre G**, Kondorosi E and Ané J-M A 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Interacts with NORK in the Nodulation Signaling Pathway. *Plant Cell* 19:3974-89 (2007)

