

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

Ph.D. értekezés

Készítette: Kevei Zoltán

Témavezetők:

Dr. Kiss György Botond

Genetika Intézet

MTA Szegedi Biológiai Központ

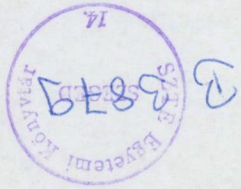
Dr. Kondorosi Éva

Dr. Kondorosi Ádám

Institut des Sciences du Végétal

Centre National de la Recherche Scientifique

2002



Tartalomjegyzék

Gyakrabban előforduló rövidítések	4
1. <u>Bevezetés</u>	5
2. <u>Irodalmi áttekintés</u>	8
2.1. A szimbiotikus nitrogénkötés	8
2.1.1. A pillangósvirágú növények jelentősége	8
2.1.2. <i>Medicago-Sinorhizobium</i> nitrogénkötő szimbiózis, mint modellrendszer	9
2.1.3 A szimbiózis kialakulása, a gümőfejlődés (noduláció) folyamata	11
2.1.4. Gümőtípusok	13
2.1.5. A szimbiotikus nitrogénkötés molekuláris folyamata	14
2.1.6. Növényi gének szerepe a gümő fejlődésében	15
2.2. A glicin-gazdag fehérjék általános jellemzése növényekben	18
2.2.1. A glicin-gazdag fehérjék szerkezete	18
2.2.2. A GRP-k indukciós mintázata kémiai, fizikai és biológiai faktorok hatására	19
2.2.3. A GRP-k sejten belüli elhelyezkedése és funkciója	19
3. <u>Előzmények</u>	21
3.1. A glicin-gazdag fehérjék pillangósokban	21
3.2. GRP-k <i>Medicago</i> fajok szimbiózisából	22
4. <u>Célkitűzések</u>	23
5. <u>Anyagok és módszerek</u>	24
5.1. Élő anyagok	24
5.1.1. Baktérium törzsek	24
5.1.2 Növényi anyagok	24
5.2. Molekuláris módszerek	26
5.2.1. DNS-könyvtárak tesztelése, szekvenálás	26
5.2.2. Southern, Northern és RT-PCR analízis	26
5.2.3. <i>In situ</i> hibridizáció	27
6. <u>Eredmények</u>	28
6.1. Glicin-gazdag fehérjéket kódoló cDNS-ek izolálása <i>Medicago</i> gümőkől, elsődleges szerkezetük vizsgálata	28

6.2.	<i>Az MsnodGRP</i> gének kifejeződésének vizsgálatai	33
6.2.1.	A <i>GRP</i>-k szervspecifikus expressziójának analízise	33
6.2.2.	A <i>Rhizobium</i>-fertőzés szerepe az <i>MsnodGRP</i> gének indukciójában	34
6.2.3.	Az egyéb <i>GRP</i>-k indukciójában szerepet játszó faktorok hatása az <i>MsnodGRP</i> génekre	36
6.2.4.	Az <i>MsnodGRP2A</i>-hoz és <i>MsnodGRP2B</i>-hez homológ <i>M. truncatula</i> gének gümőspecifikus expressziója	36
6.2.5.	Az <i>MsnodGRP</i> gének kifejeződésének időbeli alakulása a gümőben	37
6.2.6.	Az <i>MsnodGRP</i> gének expressziójának térbeli mintázata a gümőn belül	39
6.3.	A különböző <i>GRP</i> gének genetikai térképhelyének meghatározása	41
6.4.	Az <i>MsnodGRP</i> homológ <i>MtnodGRP</i>-khez tartozó gének molekuláris szerkezetének vizsgálata	43
6.5.	Funkcionális analízis: az <i>MsnodGRP</i>-k antiszensz növénytranszformációja	46
7.	<u>Az eredmények megvitatása</u>	49
8.	<u>Összefoglalás</u>	57
9.	<u>Köszönetnyilvánítás</u>	59
10.	<u>Irodalomjegyzék</u>	61
11.	<u>Summary</u>	76
11.1.	Introduction	76
11.2.	Results	77
11.3.	Discussion	82
12.	<u>Tudományos közlemények</u>	86

Gyakrabban előforduló rövidítések

GRP	glicin-gazdag fehérje (glycine-rich protein)
<i>M.</i>	<i>Medicago</i>
<i>S.</i>	<i>Sinorhizobium</i>
nod	nodulációs, gümőspecifikus
DNS	dezoxiribonukleinsav
cDNS	komplementer DNS
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripcióval előállított cDNS-en végzett polimeráz-lánreakció

1. Bevezetés

Az élő szervezetek egyik nélkülözhetetlen alkotóeleme a nitrogén. A Föld szinte kimeríthetetlen mennyiségben tartalmaz nitrogént, ennek nagyobb része azonban a legtöbb élőlény számára közvetlenül nem hozzáférhető, inert gázként van jelen a légkörben. Az eukarióta élőlények által hasznosítható kötött nitrogén viszont csak korlátozott mértékben áll rendelkezésre.

Az ökoszisztéma nitrogén-körforgalma igen szerteágazó folyamat. A nitrogéntartalmú szerves vegyületek lebomlása során keletkező ammónia közvetlenül, illetve nitríté és nitráttá történő átalakulása után (nitrifikáció) hasznosítható a növények számára, miközben a nitrogén egy része visszajut a légkörbe (denitrifikáció). Az ökoszisztéma nitrogénegyensúlyának fenntartásához tehát a kötött nitrogén pótlására, azaz folyamatos nitrogénkötésre van szükség. A nitrogénkötés történhet kémiai úton (villámlás során keletkező nitrogén-oxidok, Haber-Bosch féle ammónia gyártás) illetve a mennyiségi és egyéb szempontok (környezetkímélő, energiatakarékos) figyelembevételére miatt a sokkal jelentősebb biológiai úton.

A légkört 78%-ban alkotó nitrogéngázt kizárólag prokarióta mikroorganizmusok, azok közül is csak néhány csoport fajai képesek nitrogénforrásként hasznosítani, vagyis a dinitrogént ammóniává redukálni. A biológiai nitrogénkötés háromféle módon valósul meg a természetben, aszerint, hogy a mikroorganizmusok (1) szabadon élve (*Klebsiella*, *Azotobacter*, *Rhodospirillum*, *Clostridium*) vagy pedig valamilyen típusú növény-mikroba kapcsolat keretein belül, (2) asszociatív (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*) vagy (3) szimbiotikus együttműködésben (*Rhizobiumok*, *Frankiák*, egyéb fonalas baktériumok, egyes cianobaktériumok) végzik a nitrogén ammóniává történő redukálását. Ezek közül is a leghatékonyabb nitrogénkötési mód az endoszimbiózis, mely

során két, evolúciósan egymástól távol eső szervezet, egy prokarióta (mikroszimbionta) és egy magasabbrendű eukarióta élőlény (makroszimbionta vagy gazdanövény) között, többszörös jelcserét követően egy egyedülálló kölcsönhatás jön létre. A folyamat során a baktériumok a légköri nitrogén asszimilációját követően nitrogénnel látják el gazdanövényüket, mely különböző széntartalmú vegyületeket és a szabad oxigéntől való védelmet, de emellett megfelelő oxigénutánpótlást biztosít a mikroszimbionta partner számára. Ezért az olyan gazdanövények termesztése, mint a pillangósvirágú takarmánynövények, nem igényel költséges és környezetkárosító műtrágyázást, valamint a vetésforgóban való alkalmazásuk növeli a talaj nitrogéntartalmát.

A szimbiotikus nitrogénkötés intenzív kutatások tárgya a világ számos laboratóriumában, egyrészt, mert az összetett kommunikációs lépéseket követően kialakuló új növényi szervben megvalósuló együttélés, mint különleges biológiai jelenség felkeltette a kutatók érdeklődését, másrészt gazdasági jelentősége miatt. A kutatások célja a két partner közötti kommunikáció molekuláris szintű megismerése, a szimbiózisban résztvevő gének jellemzése és funkciójuk meghatározása. A kezdeti kutatások az egyszerűbb szerveződésű baktériumra irányultak, ezért számos, a szimbiózist kialakító és fenntartó bakteriális gén ismert már (a *Sinorhizobium meliloti* és több más *Rhizobium* faj teljes DNS szekvenciáját meghatározták). A kölcsönhatásban résztvevő növényi génekről azonban kevesebbet tudunk, ezek megismerése még csak a kezdeti lépéseknél tart.

Mind az MTA SzBK Genetikai Intézetének Lucerna Genetikai Csoportja, mind a francia munkacsoport (CNRS, Institut des Sciences du Végétal) a *Sinorhizobium meliloti* és a *Medicago* fajok közötti szimbiózis kialakításáért és működéséért felelős növényi gének megismerését és jellemzését tűzte ki célul különböző genetikai és molekuláris biológiai módszerek felhasználásával. A magyar munkacsoport főleg a genetikai megközelítéssel

történő vizsgálatokat folytatja, melyek alapjául egy részletes genetikai térkép szolgál. Ezzel szemben a francia munkacsoport a molekuláris módszerek alkalmazását (cDNS-bankok vizsgálata, microarray, élesztő kettős-hibrid rendszer alkalmazása, növénytranszformáció) helyezi előtérbe a szimbiotikus nitrogénkötésért felelős eukarióta gének feltárásában. Ph.D. munkám jelentős részét egy szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növény genetikai hátterének feltárása, illetve az ezért felelős, mutációt szenvedett gén izolálása és annak jellemzése töltötte ki (Endre és mtsai, 2002a,b). Dolgozatom témájául szolgáló, munkám fő vonalát kialakító vizsgálataim azonban egy olyan új géncsalád bemutatását tartalmazzák, melyek feltételezett működése specifikusan a szimbiotikus nitrogénkötés folyamatához kötött. A géncsaládot alkotó, ún. glicin-gazdag fehérjék kutatását (Kevei és mtsai, 2002) a két munkacsoport szoros együttműködése révén, a különböző genetikai és molekuláris módszerek ötvözésének eredményeképpen sikerült kialakítanom.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A szimbiotikus nitrogénkötés

2.1.1. A pillangósvirágú növények jelentősége

Mezőgazdasági szempontból a pillangósvirágú növények (*Leguminosae*) a világ egyik legfontosabb növény-családját alkotják, mely nagymértékben hozzájárul az emberi és állati fehérje- és olajszükségletek kielégítéséhez, valamint a talaj nitrogén utánpótlásának biztosításához, szén- és nitrogéntartalmának megtartásához (Drinkwater és mtsai, 1998). Közülük is az egyik legfontosabb takarmánynövény a lucerna (*Medicago sativa*) mind Európában, mind az Egyesült Államokban. A mezőgazdasági fontosságán túl a pillangósok külön lehetőséget biztosítanak olyan alap- és alkalmazott kutatásokra, amelyek a legjobban ismert és jellemzett növényekben, azaz sem az *Arabidopsis thaliana*-ban, sem a rizsben nem végezhetőek el. Ezek közül is a legfontosabb a szimbionta kapcsolatok vizsgálata (Albrecht és mtsai, 1999).

A szimbionta mikorrhiza gombák nemcsak a termesztett növények ásványi anyag utánpótlás és betegségekkel szembeni ellenállás szempontjából fontosak (Gianiazzi-Pearson, 1998), hanem a növényi biodiverzitást, az ökoszisztémák variabilitását és produktívását is befolyásolják (van der Heijden és mtsai, 1998). A növények nagy részével kapcsolatot kitalakító mikorrhiza-kapcsolaton kívül a pillangósvirágúakra jellemző, hogy korlátozott nitrogén-hozzáférhetőség esetén a *Rhizobiaceae* családba tartozó talajbaktériumokkal is képesek szimbiózisra lépni. Ilyenkor a növények gyökerén egy új szerv, a gyökérgümő alakul ki, melyben endoszimbionta baktériumok végzik a légköri nitrogén redukcióját, ellátva így a



növényt kötött nitrogénnel, ami egyben szükségtelenenné teszi a talajjavításra használt, környezetszennyező és drága műtrágyák használatát. Ezen kapcsolatok vizsgálata nemcsak a mezőgazdasági gyakorlat szempontjából fontos, hanem lehetőséget nyújt a különféle növény-mikroorganizmus kölcsönhatások, így a szimbionta és patogén kapcsolatok közötti hasonlóságok és különbségek feltárására is.

Ugyanakkor meg kell említeni egy másik nitrogénkötő szimbiózis létezését is, amely például a *Frankia (Actinomycetales)* és az *Alnus* „aktinorhiza” kölcsönhatásából alakulhat ki (Wall, 2000) és amellyel kapcsolatos kutatások az utóbbi években kezdtek szélesebb körben elterjedni.

2.1.2. *Medicago-Sinorhizobium* nitrogénkötő szimbiózis, mint modellrendszer

A nitrogénkötő szimbiózis rendszerének tanulmányozására szükség volt egy modellkapcsolat kiválasztására. Számos előnyös tulajdonsága miatt az utóbbi években a termesztett lucerna két közeli rokona, a *Medicago truncatula* és a diploid *Medicago sativa* alfajok váltak a növény-mikroorganizmus kapcsolatok modellnövényévé (Barker és mtsai, 1990). E fajok sok tulajdonságban hasonlítanak a molekuláris biológia modellnövényéhez, az *Arabidopsis thaliana*-hoz: diploid kromoszómakészletük hordozza kisméretű genomjukat, mely hozzávetőlegesen alig 4-5-szöröse az *Arabidopsis*-ének. További kedvező tulajdonságuk, hogy genomjukba idegen gének beépítése viszonylag egyszerű módszerekkel kivitelezhető, mely hatékony és gyors embrióképzéssel illetve regeneratív képességgel párosul (Trinh és mtsai, 1998; Boisson-Dernier és mtsai, 2001). A pillangósvirágú növények vizsgálatának szempontjából az is fontos, hogy ezek a modellnövények viszonylag közeli rokonai az Európában termesztett fajoknak, mint például a lucernának, a borsónak vagy a lencsének, így

genomi struktúrájukról nyert információk nagy valószínűséggel felhasználhatóak ezen fajok genomi vizsgálatának esetében is. A növényi vizsgálatok hatékonyságát növeli, hogy a *Medicago* fajok prokarióta partnere, a *Sinorhizobium meliloti* a legjobban ismert szimbionta baktérium, melyből több száz mutánst állítottak elő, s amely genomjának teljes szekvenciája ismert (Galibert és mtsai, 2001). Ugyanakkor mindkét *Medicago* fajból izoláltak számos, természetes és mesterségesen indukált mutánst, melyek egy része nemcsak a baktériumokkal, hanem a mikorrhiza gombákkal kialakított szimbiotikus kapcsolatukat is befolyásolta (Peterson és Barnes, 1981; Catoira és mtsai, 2000). Bár a fent említett két *Medicago* faj rendkívüli hasonlósága ellenére számos tulajdonságban különbözik, mégsem versenyeznek a modellnövény szerepének kizárólagosságáért, hanem egymást kiegészítő előnyös tulajdonságaikat kombinálva integrálhatóak egyetlen modellrendszerbe.

A *Medicago-Rhizobium* kapcsolatok vizsgálata egyéb kutatási területekhez is jó alapként szolgálhat. Ilyen például a speciális szerv, a gümő merisztémájának a vizsgálata, ami azért előnyös, mert lehetőség van a merisztéma képződés és működés szabályozásának kutatására a növény életképességének befolyásolása nélkül. A szimbiózis kialakulása során tanulmányozhatók azok a folyamatok, hogy a növény miként képes a patogének által kiváltott válaszreakcióit elkerülni, amikor szimbionta mikroorganizmussal kerül kapcsolatba. Fontos lehet még az úgynevezett infekciós fonál kialakulásának és fejlődésének vizsgálata azért is, mert a pollentömlő növekedésének mechanizmusa is hasonló elemeket hordozhat.

2.1.3. A szimbiózis kialakulása, a gümőfejlődés (noduláció) folyamata

A *Rhizobium* és pillangósvirágú gazdanövények (*Medicago*, *Pisum*, *Melilotus* fajok, stb.) közötti sorozatos, molekuláris szintű jelcserét követően mindkét partnerben morfológiai és fiziológiai változások következnek be, mely végén egy kölcsönös előnyökön alapuló együttélés jön létre.

A szimbiózis fontos tulajdonsága, hogy a *Rhizobiaceae* baktérium család egyes tagjai szigorú gazdaspecifitást mutatnak a különböző pillangósvirágúakkal szemben, melynek molekuláris háttere már ismert. A folyamatok első lépéseként a két partner között közvetlen jelcsere játszódik le, ami egymás kölcsönös felismeréséhez vezet. A pillangósvirágú növények folyamatosan termelnek olyan molekulákat (flavon és izoflavon vegyületeket), melyeket a talajban található Gram-negatív *Rhizobiumok* speciális jelmolekulaként érzékelnek. A kibocsátott gazdaspecifikus összetételű flavonoid molekulák egyrészt a növényi gyökér irányába vonzzák a baktériumokat, másrészt egy, a baktériumban folyamatosan termelődő fehérjével, a *NodD* fehérjével kapcsolatba kerülve a szabadon élő baktériumban nem működő, ún. gümőképzési (nodulációs vagy *nod*) gének transzkripcióját indítják be. A *nod* gének termékei válaszként egy jelmolekula-családot, az ún. Nod-faktorokat termelik a baktériumban, amelyek a környezetbe kijutva a gazdanövényben elindítják azokat a specifikus fiziológiai és morfológiai változásokat, melyek gümőfejlődést eredményeznek. A tisztított Nod-faktor a szerkezeti analízis alapján D-glükózamin β -1,4-tetraszaharidnak bizonyult (ritkábban előfordulhatnak három vagy öt tagból álló molekulák is). A molekula három aminocsoportjához acetilcsoportok kapcsolódnak, a negyedik, a nem redukáló végen található glükózon elhelyezkedő aminocsoporthoz pedig egy 16 vagy 18 szénatomszámú telítetlen zsírsavlánc kötődik (Lerouge és mtsai, 1990). Ez utóbbi szénlánc hossza és telítetlen

kötéseinek száma, illetve a glükóz molekulákhoz kapcsolódó egyéb csoportok (*S. meliloti* esetén szulfát, egyéb fajoknál acetyl-, fukozil-, stb. csoportok) határozzák meg a Nod-faktor gazdaspecificitását (Schultze és mtsai, 1994).

Habár kísérletekkel igazolták, hogy baktérium jelenléte nélkül, tisztított Nod-faktor hatására is indukálható a gümőképzés folyamata, a valódi fizikai kölcsönhatás a megfelelő *Rhizobium* fajnak a növény gyökérszőrein történő megtapadásával és a gyökérszőrök görbülésével kezdődik (Schultze és Kondorosi, 1998; Gálvez és Crespi, 2000). Ez az úgynevezett „pásztorbot” struktúra kialakulásához vezet, ahol a baktérium behatolásával megkezdődik az infekciós fonál képződése. Ezzel párhuzamosan a vaszkuláris rendszer xylem-hez közel eső részén a kortikális sejtek osztódása is megindul, ami a gümő-primordium kialakulását és az amiloplasztisz szám emelkedését váltja ki. A meggörbült gyökérszőrökbe a növényi sejtfa sérülésein keresztül bejutott baktériumok növekedésével és osztódásával az infekciós fonál a gyökérkéregben növekszik tovább, ám csak kis százalékuk (1-5%) éri el a gümő-primordium sejtjeit (Vasse és mtsai, 1993). A primordiumba behatoló infekciós fonál beindítja a kortikális sejtek differenciációját, ami a sejtek megnagyobbodásával jár együtt. A baktériumok a sejt citoplazmájában bakteroidokká alakulnak, melyeket speciális, növényi eredetű ún. „peribacteroid” membrán vesz körül (Hirsh, 1992). A nitrogénkötő bakteroiddá válás számos egyéb morfológiai változást is maga után von. A kifejlődött gümőkben működő, a bakteroidok által termelt nitrogenáz enzim képes a légköri nitrogént ammóniává alakítani, ami a növényi sejt citoplazmájába exportálva felhasználhatóvá válik a gazdanövény számára.

2.1.4. Gümőtípusok

A gümők kétféle típusúak lehetnek: indeterminált vagy determinált gümők (Hirsh, 1992). A mérsékelt övi növények (például borsó vagy lucerna) esetében, a többségében gyökéren kialakuló indeterminált gümők fejlődése a gyökérkéreg belsőbb, a vaszkuláris rendszerhez közelebb eső részén (inner cortex) kezdődik meg. A gyökérkéreg külsőbb rétegeiben elhelyezkedő sejtek mikrotubuláris sejtvezeték elrendeződése is megváltozik, ezek a sejtek alakítják ki a preinfekciós fonál szerkezetét, ami lehetővé teszi a későbbi infekciós fonál behatolását (Timmers és mtsai, 1999). Az érett indeterminált gümő legfontosabb jellemzője a folyamatosan osztódó apikális merisztéma, ami a gümő növekedéséért felelős. Az ilyen gümők a differenciáció mértékének megfelelően különböző rétegekre tagolódnak (Vasse és mtsai, 1990): az I-es zóna vagy merisztéma; a II-es zóna vagy inváziós zóna, ahol a baktérium behatol a növényi sejt citoplazmájába; a II-III-as interzóna, ahol a baktériumok bakteroidokká alakulnak és az amiloplasztisz szám megemelkedik; a III-as zóna vagy nitrogénkötő zóna, ahol a nagy, bakteroidokat tartalmazó sejtek, illetve a kisebb, bakteroidmentes sejtek helyezkednek el, amik a kötött nitrogén asszimilációját végzik; és végül a IV-es zóna vagy szenescens zóna, amely a pusztuló bakteroidokat és növényi sejteket tartalmazza. A gümő zónáit periférikus sejtréteg veszi körül, ami egy külső és egy belső kéregre tagolódik.

Determinált gümők általában a trópusi illetve szubtrópusi növényeken alakulnak ki, ilyen növény például a szója vagy a bab. A gümő primordium a gyökérkéreg külső rétegeiben képződik, merisztematikus aktivitását a gümőfejlődés korai szakaszában elveszti. Ezért a gümő inkább a sejtek megnagyobbodásának, mint a sejtek osztódásának köszönhetően

növekedik és csak átmeneti szerkezeti differenciálódás történik. Az indeterminált gümökhöz hasonlóan a determinált gümöket is külső és belső kéreg védi.

Nitrogénmentes környezetben bizonyos *M. sativa* fajták úgynevezett spontán gümözésre képesek. A spontán gümökből hiányzik a szimbiotikus partner, a *S. meliloti* baktérium (Caetano-Anollés, 1992). Struktúrájukban hasonlítanak a baktérium által indukált gümökhöz, merisztémával, differenciálódó és központi zónákkal rendelkeznek, sejtjeik nagymennyiségű keményítőt tartalmaznak. A spontán gümők kialakulásának lehetősége rámutat arra, hogy a gümőképzés és gümőfejlődés főbb lépéseiért a növényi partner felelős.

A gümők evolúciós eredete ma sem tisztázott. Két fő hipotézis létezik, az egyik szerint a gümők egy már létező, szár-, oldalgyökér-eredetű vagy szénhidrát-raktározó szervből alakultak át; a másik feltevés, hogy a növény és egyéb organizmus kölcsönhatásának eredményeként egy új, *sui generis* szerv fejlődött ki a megfelelő funkció érdekében (Hirsch és LaRue, 1997).

2.1.5. A szimbiotikus nitrogénkötés molekuláris folyamata

A nitrogénkötés egy paradox folyamat, hiszen a nitrogenáz enzim működéséhez energiára van szükség, ami a sejtlélegzésből származik, ugyanakkor az oxigén erősen gátolja az enzim aktivitását. Hogy mégis zavartalanul működhessen a nirtogénkötés rendszere, az oxigén koncentrációját a növényi partner alacsony, mikroaerob szinten tartja a gümőben, míg a baktériumban egy szimbiózis-specifikus, nagy oxigénaffinitású terminális oxidáz működik. A gümő perifériális belső kérgében, illetve a II-es és III-as zóna között a szorosan összetapadt sejtek fizikai gátként szolgálnak, míg a gümő belsejében egy gümőspecifikus oxigénkötő

protein, a leghemoglobin biztosítja a bakteroidok megfelelő oxigénellátását (Hunt és Layzell, 1997).

A redukált, ammónia formában kötött nitrogén mérgező vegyület a növény számára. Ezért a növény a különböző enzimek összehangolt munkájának eredményeként aminosavakká alakítja át az ammóniát. Ezek közül is a legfontosabbak a glutamin-szintáz (GS) és a glutaminsav-szintáz (GOGAT) (Vance és Gantt, 1992). A GS/GOGAT átalakítási kaszkád a legmeghatározóbb nitrogén-asszimilációs folyamat a növényekben. Ehhez szervesen kapcsolódik a szénhidrát-forgalom, a citromsav-ciklus (Krebs-ciklus), ami mind a nitrogén asszimilációjához, mind az aktív bakteroid anyagcseréjéhez hozzájárul. A legfontosabb enzim a foszfoenol-piruvát-karboxiláz, mely közvetve felelős a Krebs-ciklus beindításáért, így az ammónium aminosavvá átalakításáért is.

Az indeterminált gümőkől a kötött nitrogén főleg aszparagin és glutamin aminosavak formájában exportálódik, a nitrogéntartalmú vegyületeknek ez a két típusa van jelen a legnagyobb mennyiségben a mérsékelt övi pillangósvirágú növények phloem-szöveteiben. Ezzel szemben a determinált gümők főleg ureid típusú vegyületeket juttatnak a növény többi részébe.

2.1.6. Növényi gének szerepe a gümő fejlődésében

A gümőfejlődés molekuláris mechanizmusának analíziséhez a különböző folyamatokban résztvevő gének és géntermékek multidiszciplináris vizsgálatára van szükség. Az organogenezis folyamata során számos gümőspecifikus növényi fehérjét (ún. nodulin) kódoló gén (van Kammen, 1984) indukálódik és vesz részt a különböző lépésekben. Az időbeli megoszlás alapján a nodulinoknak két nagy csoportját különítjük el. A nitrogénkötés

beindulása előtt aktiválódó géneket „korai-nodulin” géneknek nevezzük (early nodulin vagy *ENOD*), míg a „késői-nodulinok” expressziója a nitrogénfixálással párhuzamosan vagy később indukálódik. Különböző stratégiákat használtak a gümőben és a gyökérben eltérően expresszáló gének meghatározására. Az egyik módszer a két szervből izolált RNS-ekből készített cDNS termékek kifejeződésének összehasonlítása (Gamas és mtsai, 1996; Frugier és mtsai, 1998). Az izolált gének funkciójára az adatbankokban elvégzett szekvencia-összehasonlítások, illetve a gümőben mutatott hely- és időspecifikus kifejeződési mintázatuk alapján következtettek. Úgy tűnik, hogy többségük sejtfalhoz kapcsolt fehérjét kódol, melyek valószínűleg a gümőkialakulás és fejlődés során fellépő sejtfal-modifikációkban játszanak szerepet, mint például a különböző prolin-gazdag fehérjék (proline-rich protein vagy PRP), mint az *ENOD2*, *ENOD5*, *ENOD10*, *ENOD12*, *ENOD13*, *PRP-4*, vagy akár az extenzinek és az *Mtripl* által kódolt peroxidáz is (Bladergroen és Spaink, 1998). Egyéb vizsgált nodulinok homológiát mutatnak a lektinekhez (Bauchrowitz és mtsai, 1996), a chalcone-szintáz és chalcone-izomeráz génekhez (Mathesius és mtsai, 1998) illetve kitinázokhoz (Goormachtig és mtsai, 1998), de a kötött nitrogén átalakításban közvetlenül résztvevő gének, mint a *GS*, *GOGAT*, *PEPC* vagy karbonik-anhidráz (Shi és mtsai, 1997) is a nodulinok közé tartoznak. Ezek, a már beindult nitrogénkötés ideje alatt kifejeződő gének a gümő szimbiotikus zónájában expresszálódnak, kivéve a karbon-anhidrázt, mely gén transzkriptumát az oxigén-permeabilitásért felelős belső gümőkéregben mutatták ki (Coba de la Pena és mtsai, 1997). További fontos nodulinok a leghemoglobinok, a peribakteroid-membrán alkotóelemei (pl. *NOD26*), különböző peptid-transzporterek, a citokróm P450 (Szczyglowski és mtsai, 1997), illetve a repetitív szerkezettel rendelkező *Nms-25* (Kiss és mtsai, 1990).

A nodulin gén elnevezést eredetileg, a kizárólag gümőben kifejeződő gének megjelölésére használták (van Kammen, 1984). A vizsgálatok azonban bebizonyították, hogy az elsősorban gümőben indukálódó nodulin-gének egyéb, nem-szimbiotikus szövetekben is kifejeződnek, sőt más, nem-pillangós növényekben is találtak homológot néhány esetben (Kouchi és mtsai, 1999). Ezek az eredmények az sugallják, hogy a noduláció számos eseménye visszavezethető olyan ősi, közös funkciókra, illetve génekre, amelyek léteznek mind pillangós, mind nem-pillangós növényekben (Bladergroen és Spaink, 1998).

Az utóbbi időben elterjedtek a szisztematikus szekvenálási eljárások, melyek nagyszámú gén azonosítását teszik lehetővé a különböző gümő-specifikus cDNS könyvtárak felhasználásával (Györgyey és mtsai, 2000). A funkcionális genomika térhódítása a modell pillangósok kutatási területén elősegíti, hogy átfogó információval rendelkezünk a noduláció folyamata során kifejeződő gének expressziós mintázatáról (Cook és mtsai, 1997). Ezek a molekuláris módszerek jelentős segítséget nyújtanak a gümőfejlődés genetikai hátterének feltárásához.

A nodulációban résztvevő gének azonosításához vezető másik út a mutagenézis. A különböző pillangósokból számos szimbiotikus mutánst sikerült izolálni. Az normálistól eltérő gümőképzést mutató növények főleg két típusba sorolhatóak: I) a megváltozott gümőszámú mutánsok, melyek vagy nem tudnak gümőt kialakítani (Nod⁻), vagy pedig megnövekedett számú gümő képzésére alkamasak (szupernodulálók), II) a kialakult gümőben nem történik nitrogénfixálás (Fix⁻). Az indeterminált gümőt képző *M. truncatula* és determinált gümőt kialakító *Lotus japonicus* szolgáltatja a legnagyobb számú, különböző módszerekkel előállított (EMS, T-DNS és transzpozon inszerciós mutagenizált) mutáns növények csoportját, melyek között találhatóak a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához nélkülözhetetlen génekben mutációt szenvedett egyedek is. Bár a világ számos

laboratóriumában próbálják azonosítani a mutációt szenvedett géneket, a kutatások még csak kezdeti stádiumban vannak. Ennek eredményeként, szimbiotikus mutánsok segítségével a magyar munkacsoportban (MTA SzBK Genetikai Intézet Lucerna Genetikai Csoport) sikerült először azonosítani a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának egyik kezdeti lépéséért felelős növényi gént, melynek azonosításához a térképezésen alapuló génizolálás módszerét alkalmaztuk (Endre és mtsai, 2002a,b).

2.2. A glicin-gazdag fehérjék általános jellemzése növényekben

2.2.1. A glicin-gazdag fehérjék szerkezete

A növényi gének egy rendkívül változatos, nem homogén csoportját alkotja a glicin-gazdag fehérjék (glycine-rich protein vagy GRP) családja, melynek tagjai a magas glicin aminosav tartalom mellett több eltérő strukturális tulajdonsággal rendelkeznek. Többségükben a GGGX, GGXXXGG vagy a GXGX, kvázi-repetitív glicin-gazdag motívumot tartalmazzák, melyek különböző méretű fehérjéket alkotnak (Sachetto-Martins és mtsai, 2000). Ugyancsak jellemző erre a géncsaládra, hogy a fehérjék aminoterminális részén szignálpeptid helyezkedik el, illetve bizonyos képviselői egyéb jellegzetes struktúrákat is hordoznak, mint például a hideg-sokk domén (Kingsley és Palis, 1994), cisztein-gazdag mintázat (Rohde és mtsai, 1990) vagy RNS-kötő motívum (RNP-1 és RNP-2) (Dreyfuss és mtsai, 1998).

2.2.2. A *GRP*-k indukciós mintázata kémiai, fizikai és biológiai faktorok hatására

A különböző *GRP*-ket kódoló gének eltérő módon és sejtek különböző részeiben expresszálnak, ami különböző fiziológiai folyamatokban való részvételre utal. Többségük kémiai, fizikai és biológiai faktorok által indukálódik, illetve a növényfejlődés különböző szakaszaiban eltérően regulálódik.

Ozmotikus stressz (Gomez és mtsai, 1988; Xu és mtsai, 1995), hideg-sokk (Carpenter és mtsai, 1994) és fizikai sérülés (Showalter és mtsai, 1991) különböző *GRP* géneket aktiválnak. Ugyanakkor a fény (Kaldenhoff és Richter, 1989) és a cirkadián ritmus (Cretin és Puigdomenech, 1990) is hatással van *GRP* gének indukciójára.

Szalicil-sav (Hammond-Kosack és Jones, 1996), abszciszin-sav (de Oliveira és mtsai, 1990), metil-jázmonsav (Molina és mtsai, 1997) vagy etilén (Memelink és mtsai, 1990) számos *GRP* gént indukál, míg az auxin negatív reguláló hatást fejt ki bizonyos glicin-gazdag fehérjékre (Reddy és Poovaiah, 1987). Patogén támadás, mint például vírus- (Linthorst és mtsai, 1990) vagy gombafertőzés (Molina és mtsai, 1997) ugyancsak *GRP* gének indukciójához vezet. Más esetben egy RNS-kötő *GRP* expresszióját váltja ki a lucerna gyökércsúcsát támadó fonálféreg, *Meloidogyne incognita* nematoda (Potenza és mtsai, 2001).

2.2.3. A *GRP*-k sejten belüli elhelyezkedése és funkciója

A *GRP*-k nagyrésze sejtfa-, illetve membrán-kötött, de néhány képviselőjük megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is (Sachetto-Martins és mtsai, 2000). Szövet- és szervspecifikus vizsgálatok különböző *GRP* gének transzkripció aktivitását mutatták ki protoxylem (Keller és mtsai, 1989), xylem (Harrak és mtsai, 1999) és phloem elemekben, de

egyedek gének megnyilvánultak az epidermisz szöveteiben is (Condit, 1993). Ezen kívül pollen-specifikus GRP-eket azonosítottak virágból (Mousavi és mtsai, 1999), illetve kifejezetten a gyümölcsérés folyamata során kifejeződő glicin-gazdag fehérjéket is izoláltak (Santino és mtsai, 1997).

Sejtfalban való elhelyezkedése miatt, számos magasan expresszázó GRP-t strukturális, sejtfal-felépítő komponensként tartanak számon (Cassab, 1998). Ezen a tulajdonságon osztoznak egyéb, ugyancsak repetitív szerkezettel rendelkező prolin-gazdag illetve hidroxiprolin-gazdag fehérjékkel (Cassab, 1998). Ennek ellenére számos, a GRP-k regulációját vizsgáló tanulmány elemzi a növényfejlődésben betölthető különböző szerepüket. Valószínűnek tartják a sejtek lignifikálásában való részvételüket (Condit, 1993), sejtmembrán-citoszkeleton illetve sejtmembrán-sejtfal közötti kapcsolatok kialakításában végzett feladataikat (Marty és mtsai, 1996). Az RNS-kötő motívummal rendelkező GRP-k az mRNS (messenger vagy hírvívő RNS)érésére és a génjének szabályozására lehetnek hatással (Heintzen és mtsai, 1994). Egyéb glicin-gazdag fehérjékről kimutatták, hogy lipid-tartalmú struktúrák stabilitását módosíthatják (Ross és Murphy, 1996). Mégis az egyetlen „valódi” GRP funkcióról az *Arabidopsis thaliana* AtGRP3 esetében beszélhetünk. Erről a fehérjéről bebizonyosodott, hogy az úgynevezett WAK1 (wall-associated receptor kinase - sejtfal-kötött receptor kináz) szignáltranszdukciós mechanizmusában vesz részt, ahol a WAK1 fehérjéhez kapcsolódva aktiválja annak, a KAPP (kinase-associated phosphatase - kináz-kötött foszfatáz) fehérjére kifejtett hatását (Park és mtsai, 2001; Anderson és mtsai, 2001).

A pillangósok közül lucernából is izoláltak glicin-gazdag fehérjéket (Ferullo és mtsai, 1997). Ezek a fehérjék a hideg-aklimatizálódás során jelennek meg a növényben. Megállapították, hogy a különböző *M. sativa* fajták hidegtűrése valószínűleg kapcsolatba hozható ezen GRP gének kifejeződésének mértékével.

3. Előzmények

3.1. A glicin-gazdag fehérjék gümőkben

Néhány glicin-gazdag fehérjét kódoló gént azonosítottak pillangósvirágúak és *Rhizobium*-ok szimbiotikus együttéléséből származó nitrogénkötő gümőkben is. A *Vicia* a *Medicago* fajokhoz hasonlóan képes gümőképzésre, ami a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* baktériummal való együttélés során jön létre. A *Vicia faba* (lóbab) faj gümőiből készített cDNS-könyvtár vizsgálata során több olyan cDNS-t izoláltak, melyek GRP-eket kódoltak (Küster és mtsai, 1995; Schröder és mtsai, 1997). A részletes kutatások kiderítették, hogy az öt különböző *GRP* gén (*Vfnod-GRP1*, *Vfnod-GRP2*, *Vfnod-GRP3*, *Vfnod-GRP4* és *Vfnod-GRP5*) közül három a korai, míg kettő a késői nodulinok csoportjába sorolható és egyikük sem fejeződik ki más növényi szervben, csak kizárólagosan a gümőben. Az időbeli kifejeződések eltéréseinek ellenére a *GRP* gének gümőn belüli expressziója hasonlóan bizonyult. A szövettani vizsgálatok szerint mindegyik *GRP* aktív az indeterminált gümő II-III-as interzóna rétegében, míg a *Vfnod-GRP5* az inváziós, II-es zónában is expresszál. Ugyancsak kifejeződnek a nitrogénkötő, III-as zónában, viszont a *Vfnod-GRP3* csak a zóna disztális részén. Mindegyik *GRP* rendelkezik szekréción szignálpeptid szekvenciával. A fehérjék glicin-gazdag régiója nem tartalmaz specifikus ismétlődő motívumokat és glicin tartalmuk is csak 20-30%-os, azaz nem éri el azt a magas 70-80%-ot, mely jellemző az egyéb, már elemzett *GRP*-kre. Egy másik vizsgált pillangósból, a szójából (*Glycine max*) izolálták a Nodulin-24-et, mely fehérje a gümőkben kialakuló peribakteroid membrán egyik alkotó eleme (Cheon és mtsai, 1994). A fehérje elsődleges szerkezete ugyancsak szekréción szignálpeptid szekvenciát és magasabb glicintartalmat mutat. Egy másik típusú nitrogénkötő kapcsolat, a

Frankia és az enyves éger (*Alnus glutinosa*) közötti aktinorhiza-szimbiózis kialakulása, mely folyamat során ugyancsak kifejeződnek olyan gének, melyek terméke glicin-gazdag fehérje (Pawlowski és mtsai, 1997). A fentiekhez hasonlóan a két vizsgált fehérje is rendelkezik szignálpeptiddel, viszont a többiekkel ellentétben mindkettőben magas hisztidin aminosav tartalom is kimutatható.

3.2. GRP-k *Medicago* fajok szimbiózisából

Az utóbbi időben, a francia munkacsoportban készült *Medicago* cDNS könyvtárak vizsgálata ugyancsak kimutatta olyan gének létezését, melyek átíródása GRP-eket eredményez. Így találták meg a *Vicia*-ból izolált *Vfenod-GRP5* gén homológját mind *M. sativa* (Györgyey és mtsai, 2000), mind *M. truncatula* (Jiménez-Zurdo és mtsai, 2000) gümős-specifikus cDNS könyvtár szisztematikus tesztelése és szekvenálása során. Ugyancsak a *Vfenod-GRP5* homológjának tűnik az *NMs22* is (Ganter és mtsai, 1998), mely gén kifejeződése a gümő szimbiotikus sejtjeihez kötött.

A számos kutatás ellenére a szimbiotikus nitrogénkötés során kimutatott néhány glicin-gazdag fehérjének részletesebb vizsgálatára nem került sor, a nodulációs folyamatokban betöltött szerepüket nem ismerjük.

4. Célkitűzések

Az MTA SzBK Genetika Intézetének Lucerna Genetikai csoportjában, illetve a francia munkacsoportban (CNRS, Institut des Sciences du Végétal) zajló kutatások célja a szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó gének megismerése és jellemzése. Dolgozatom témáját képező vizsgálatok elindításakor a következő feladatokat tűztük ki célul:

1. A *Vicia faba*-ban jellemzett gümőspecifikus *GRP* gének homológjainak izolálása *Medicago* fajokból készített cDNS könyvtárakból.
2. Az izolált *GRP* gének szövetspecifikus kifejeződésének vizsgálata, hogy megállapítsuk vajon valóban gümőspecifikus aktivitással rendelkeznek-e.
3. A *GRP* gének kifejeződésének nyomonkövetése a gümőfejlődés során. Információ gyűjtése a különböző *GRP* gének működésének időbeli alakulásáról; mikor indul meg a gének expressziója, mikor érik el a maximumukat, illetve mikor csökken le a transzkripció aktivitásuk.
4. A *GRP* gének működéséhez szükséges molekuláris körülmények megállapítása, milyen bakteriális jel felelős a gének aktivációjáért.
5. A gének expressziójának térbeli meghatározása. A gümön belül mely zónákban fejeződnek ki, esetleges eltérő zonalitásuk az expresszió időbeli eltéréseit tükrözi-e.
6. A magyar munkacsoportban elkészített lucerna genetikai térkép segítségével a *GRP* gének elhelyezkedésének meghatározása a lucerna kapcsoltsági csoportjain belül.
7. A génekhez tartozó genomi klónok izolálása, szekvenciájuk megállapítása, a gének szerkezetének megismerése.
8. Antiszensz génkonstrukciók és növénytranszformációs kísérletek segítségével a *GRP*-k nodulációban betöltött szerepének vizsgálata.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Élő anyagok

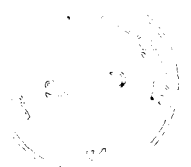
5.1.1. Baktérium törzsek

A *M. sativa* és a *M. truncatula* nodulációs tesztjeihez a következő *Rhizobium* törzseket használtuk: (I) vad típusú, Rm41-es *Sinorhizobium meliloti*; (II) Sm8368: Sm1021-es törzs Bac^+ származéka, mely *Tn_{pho}* inszerciót hordoz a *bacA* génjében (Glazebrook és mtsai, 1993); (III) AK1492-es törzs, egy *ExoK_{ps}Inf* Rm41 vonal, mely mutáns az *exoB* génben, illetve *Tn5* inszerciót hordoz a *fix23*-as régióban, mely kapszuláris poliszaharid szintéziséért felelős (Kondorosi és mtsai, 1984; Putnoky és mtsai, 1988). A baktériumokat 30°C-on, YTA táptalajon (Orosz és mtsai, 1973) növesztettük, a mutáns törzsek esetében a táptalajt 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamicinnel egészítettük ki.

A növénytranszformációs kísérletekhez EHA105-ös *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtunk (Hood és mtsai, 1993).

5.1.2 Növényi anyagok

A *Medicago sativa* ssp. *sativa* Sitel fajta és *Medicago truncatula* R-108-as ökotípus (Hoffman és mtsai, 1997) magjait 20%-os Pasti-chlor (Argos) oldatban, szobahőmérsékleten, 30 percig, gyengén rázatva sterilizáltuk, majd steril vízben 4-szer mostuk és 24 órán keresztül sötétben, 1%-os agar lemezen csíráztattuk. A nodulációs kinetikai kísérlethez a csíranövényeket négyzet alakú petri-csészében, nitrogénmentes, 1% agart tartalmazó



táptalajban (Crespi és mtsai, 1994), 28°C-on növesztettük. 4-5 nap után, a gyökereket „pontinokulálással” (spot-inoculation) fertőztük Rm41-es *S. meliloti* törzssel. Ezután mintákat gyűjtöttünk 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 18, 21, 28 napos gümő-primordiumból és gümőből, illetve kontrollhoz a nem fertőzött gyökérből. A genetikai térképezéshez használt növényi anyagokat friss, fiatal hajtásokból gyűjtöttük.

Nagy mennyiségű RNS izolálásához a csíranövényeket nodulációs tesztkamrában növesztettük (Hoffman és mtsai, 1997). A gümözési teszthez a növénykéket 1 hétig alacsony nitrogéntartalmú táptalajon neveltük, majd vad típusú *S. meliloti*-val fertőztük. A vad típusú gümőket a *M. sativa*-ról a 7. és a 21. napon, míg a *M. truncatula*-ról a 9., a 20. és a 29. napon gyűjtöttük. A Bac⁻ és Exo⁻ mutánsok esetében a gümőket a fertőzés utáni 2. - 3. héten szedtük le. Lucerna virágot, gyökeret, hipokotilt, levelet és szárát ugyancsak 2-3 hét után gyűjtöttünk a gazdag nirtogéntartalmú oldatban nőtt növényekről. Spontán gümőket a 2-3 hétig baktérium és nitrogénmentes körülmények között fejlődő, kiváló embriogenezissel rendelkező *M. sativa* ssp. *varia* A2 vonalról tudtunk gyűjteni.

A transzgenikus *M. truncatula* R-108-as növényeket Trinh és mtsai (1998) módszerei alapján állítottuk elő. A *GRP*-cDNS-eket a szignálpeptid-szekvenciát kódoló rész elhagyásával, fordított orientációban klónoztuk a CaMVpromóter mögé, a pB35S bináris növényi vektorba, amely *bar* szelekciós-gént tartalmazott a transzgenikus növények BASTA-herbicidek rezisztenciájához (White és mtsai, 1990; Becker és mtsai, 1992). A transzformáns növények regenerációjához, illetve a további utódnemzedékek szelekciójához is a BASTA herbicidet alkalmaztuk.

5.2. Molekuláris módszerek

5.2.1. DNS-könyvtárak tesztelése, szekvenálása

A lucerna *GRP*-cDNS-klónokat a *M. sativa* ssp. *varia* A2 növény fiatal gümőiből készített cDNS-könyvtár *Vfnod-GRP1*, *Vfnod-GRP2*, *Vfnod-GRP3*, *Vfnod-GRP4* és *Vfnod-GRP5* (Küster és mtsai, 1995; Schröder és mtsai, 1997) *Vicia faba* próbákkal való hibridizációs tesztelésével azonosítottuk. Az *MtnodGRP2A* és *MtnodGRP2B* cDNS-klónokat egy *M. truncatula* R-108-as vonalból készült, gümőspecifikus cDNS könyvtárból izoláltuk (Györgyey és mtsai, 2000). A *nodGRP* gének genomi szekvenciáinak izolálásához a *M. truncatula* Jemalong A17 ökotípusból készült BAC (Bacterial Artificial Chromosome) könyvtárat használtuk (Nam és mtsai, 1999).

A klónok szekvenciáját a lánc-terminációs módszer (Pharmacia) segítségével és a 373A típusú automata lézer szekvenátor (Applied Biosystems) alkalmazásával határoztuk meg.

5.2.2. Southern, Northern és RT-PCR analízis

A genetikai térképezéshez használt genomikus DNS-t friss, fiatal hajtásokból izoláltuk (Dellaporta és mtsai, 1983), melyből 10-15 µg-ot emésztettünk különböző restrikciós endonukleázokkal (Amersham, Fermentas, Promega). Az egyéb DNS-izolálási munkákat Maniatis és mtsai (1982) által leírt útmutatások alapján végeztük. Az össz-RNS-eket az RNeasy mini kit (Qiagen) segítségével izoláltuk a különböző lucerna szövetekből, melyekből 8 µg-ot használtunk a Northern-blotthoz. Az RT-PCR kísérletekben 1 µg RNS-t kezeltünk

DNázzal (DNase pure, Amersham), majd M-MLV reverz-transzkriptáz (Promega) segítségével, RNáz-inhibitor (RNasin, Promega) és oligo-dT primer jelenlétében komplementer DNS-t szintetizáltunk. Az *Msenod40*-et (Crespi és mtsai, 1994), az *Msc27*-et (Györgyey és mtsai, 1991) és az *Mtc27*-et 17 ciklusban (94°C 30'', 55°C 30'', 72°C 1'), míg az *MsnodGRP*-ket, illetve a *TC40868*-at, a *TC41363*-at (TIGR database, www.tigr.org) és az *MtN29*-et (Gamas és mtsai, 1996) kódoló szekvenciákat 21 ciklusban amplifikáltuk. A gélelektroforézis után a DNS és RNS mintákat nylon-membrához (BioTrans, ICN) blottoltuk 20x SSC (DNS) illetve 10x SSC (RNS) oldatok segítségével. A próbákat „random-priming” módszerrel (Amersham), $\alpha(^{32}\text{P})$ -dCTP radioaktív nukleotiddal jelöltük. A hibridizációt 36 órán keresztül, 65°C-on, 0.5 M Na-foszfátot (pH 7.2) és 7% SDS-t tartalmazó pufferben (Church and Gilbert, 1984) végeztük, majd a filtereket kétszer mostuk 2x SSC / 0.1% SDS és 1x SSC / 0.1% SDS oldatokban. A genetikai térképezésre használt membránok (RFLP) esetében egy 0.1x SSC / 0.1% SDS mosást is alkalmaztunk. A hibridizációs jeleket „phosphor-imager screen”-en, illetve fényérzékeny filmekken (autoradiogram) exponáltuk. A hibridizációs jelek intenzitásának normalizálásához a Phosphor-imager STORM (Molecular Dynamics) specifikus komputeres szoftverjeit használtuk.

5.2.3. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációs kísérletekhez de Almeida Engler és mtsai (2001) útmutatásait követtük. Próbaként 200 bázispár hosszúságú, ^{35}S izotóppal jelölt szensz és aniszensz RNS-eket használtunk, melyek a glicin-gazdag domént kódoló szekvenciárészeket tartalmazták. A hibridizált metszeteket Kodak NTB-2-es emulzióban exponáltuk, a hibridizációs jeleket fluoreszcens-fény mikroszkópban és CCD kamerával vizsgáltuk.

6. Eredmények

6.1. Glicin-gazdag fehérjéket kódoló cDNS-ek izolálása *Medicago* gümőkéből, elsődleges szerkezetük vizsgálata

A francia munkacsoportban már korábban elkészítették a *M. sativa* ssp. *varia* A2 növény gümőspecifikus cDNS-könyvtárát. Ezt teszteltük a különböző *Vicia faba* cDNS-klónokból (*Vfnod-GRP1*, *Vfnod-GRP2*, *Vfnod-GRP3*, *Vfnod-GRP4* és *Vfnod-GRP5*) készített hibridizációs próbákkal (Schröder és mtsai, 1997). A hibridizáció során alacsonyabb stringenciájú körülményeket biztosítottunk, hogy mind az ortológ, mind a paralóg cDNS-eket kimutathassuk. A hibridizációs tesztek eredményeképpen 37 különböző cDNS-klónt izoláltunk, melyek négy eltérő gént képviseltek. A *Vfnod-GRP1* próbával 11 cDNS-t azonosítottunk, melyek az *MsnodGRP1* gént határozták meg. A két fajban a nukleotid szekvenciák alacsony, 66%-os homológiát mutattak, ami fehérje szinten 62%-os hasonlóságot és 41%-os azonosságot jelentett. A *Vfnod-GRP4* próbával 16 megfelelő klónt találtunk, melyek két típusúak voltak; az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* klónok magas homológiát mutattak egymáshoz, ugyanakkor eltértek a *Vfnod-GRP4*-től. A *Vfnod-GRP5* hibridizációja eredményeként 10 cDNS-klónt izoláltunk, melyek az *MsnodGRP3* gént reprezentálták, nukleotid szekvenciájuk 72%-os homológiát mutatott a két faj között. Az alacsonyabb stringenciájú hibridizációs körülmények miatt, egyéb, nem gümőspecifikus *GRP*-ket is izoláltunk. Ezek között volt egy a poli-adenilációs-hely kötéséért felelős, számos növényben leírt *GRP* gén (Lee és mtsai, 1997) *Medicago* homológja, illetve egy nemrég jellemzett lucerna *GRP* szekvencia, mely egy a gyökéren élősködő *Nematoda* hatására indukálódik (Potenza és mtsai, 2001), de ezek a klónok nem kerültek későbbi tanulmányozásra.

MsnodGRP1-112aa
 MKTKL FVSACFYALLFIFLVAIMPSE **GKQSGVTKKSMINIGV** 42
 HGYANWLGRGAVQDGGKHSWANVKGSKGTSWWAS **GGKGGVGA** 84
 KGDKGGKGGGGYKIPIPGEGKGGGGK 112

MsnodGRP2A-101aa
 MKTKSII SVSFICALVFISVVAIESSKDEKKF **GEMEEFKLV** 42
 SWRPPGGSWTSHGVKRKGGKGGSKGSGSEGNNGEGGAQGGG 84
 GQIEGGKDKGSGLDARG 101

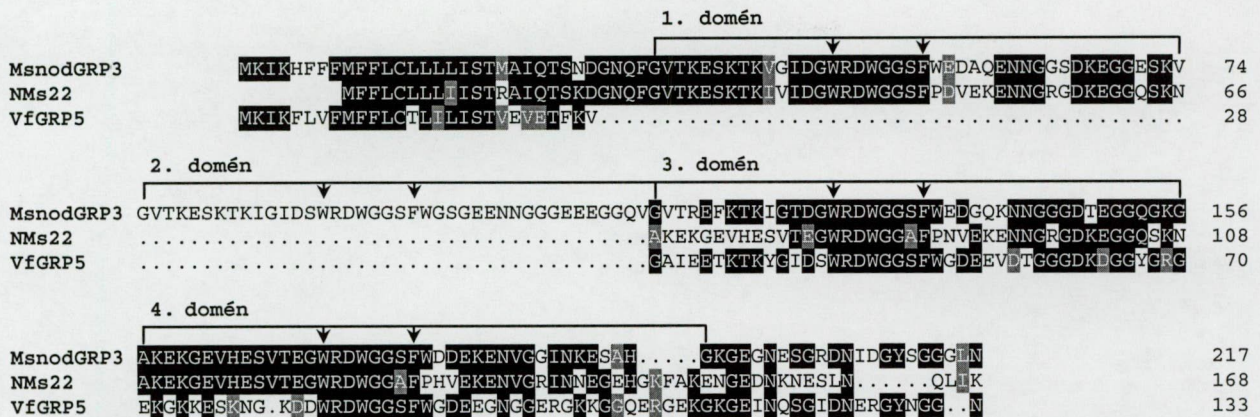
MsnodGRP2B-114aa
 MKTKSII SF SFICALVFISV VATEPSKDEKQF **GEIEEFKFKV** 42
 SWNRGAWTWPVIVVKGKGGKGGSKGSGSGNGGEGGAQGGG 84
 GQIDGGKDKGSGLDARGGENNKIGWGYLKN 114

MsnodGRP3-217aa
 MKIKHFFFMFFLCLLLLI STMAIQTSNDGNQF 32
 GVTKESKTKV **G** **I** **D** **G** **W** **R** **D** **W** **G** **G** **S** **F** **W** **E** **D** **A** **Q** **E** **N** **N** **G** **G** **S** **D** **K** **E** **G** **G** **E** **S** **K** **V** 74
 GVTKESKTKI **G** **I** **D** **S** **W** **R** **D** **W** **G** **G** **S** **F** **W** **G** **S** **G** **E** **E** **N** **N** **G** **G** **E** **E** **E** **G** **G** **Q** **V** 114
 GVTREFFKTKI **G** **T** **D** **G** **W** **R** **D** **W** **G** **G** **S** **F** **W** **E** **D** **G** **Q** **K** **N** **N** **G** **G** **D** **T** **E** **G** **G** **Q** **G** **K** **G** 156
 AKEK **G** **E** **V** **H** **E** **S** **V** **T** **E** **G** **W** **R** **D** **W** **G** **G** **S** **F** **W** **D** **D** **E** **K** **E** **N** **V** **G** **G** **I** **N** **K** **E** **S** **A** **H** **G** **K** **G** 198
 EGNESGRDNIDGYSGGGLN 217

1. ábra. A *M. sativa* gümőkben kifejeződő gének által kódolt glicin-gazdag fehérjék elsődleges szerkezete.

A glicin aminosavakat vastag betűvel, a szignálpeptidet aláhúzással jelöltük. Az MsnodGRP3 repetitív doménjeiben (33-74, 75-114, 115-156, 157-198) a legalább két doménben azonos aminosavakat fekete háttérrel, a hasonlóakat szürke háttérrel emeltük ki. A WRDWGGSFW oligopeptid motívum kezdeti és végpontját függőleges nyíllal jelöltük.

Az *MsnodGRP1*, *MsnodGRP2A*, *MsnodGRP2B* klónok szekvenciája részleges volt, nem tartalmazták a teljes hosszúságú RNS-nek megfelelő cDNS-t. Mivel a cDNS-ek 5' végi kódoló szakaszából csak rövid, néhány nukleotidot tartalmazó szekvenciárészlet hiányzott,



2. ábra. A MsnodGRP3 és homológjainak összehasonlítása.

Az MsnodGRP3, Vfenod-GRP5 (VfGRP5) és a lucerna NMs22 fehérjéinek összehasonlítása. A repetitív doméneket vízszintes vonallal, a konzervatív oligopeptideket függőleges nyíllal jelöltük. Az azonos és hasonló aminosavakat az 1. ábra szerint jelöltük.

ezért a rokon *M. truncatula*-ból készített EST (Expressed Sequence Tag) adatbázisokban (TIGR database - www.tigr.org) lefuttatott homológia-kereső programok segítségével meghatároztuk a klónok teljes szekvenciáját. Mindegyik cDNS kis méretű fehérjét kódolt. Az MsnodGRP1 112, az MsnodGRP2A 101, az MsnodGRP2B 114, az MsnodGRP3 fehérje pedig 217 aminosavból állt (1. ábra). Mindegyik GRP egy glicin-gazdag karboxiterminális részt, illetve egy aminoterminális, sejtmembránon keresztüli transzportot irányító szignálpeptidet tartalmazott, amit von Heijne (1986) algoritmus alapján határoztunk meg. Habár a GRP-k általános jellemzője a glicin-gazdag motívumok többszöri ismétlődése, sem az MsnodGRP1, sem az MsnodGRP2A és az MsnodGRP2B fehérjék nem tartalmaznak ilyen ismétlődéseket. Ezzel szemben az MsnodGRP3-ban megfigyelhető egy hosszabb ismétlődő szerkezet, 42 aminosavból álló, egymást követő négy nagyon hasonló oligopeptid, melyek mindegyike tartalmaz egy WRDWGGSFW aminosav ismétlődést (1. ábra). Az *MsnodGRP3* ortológ párját, az *MtnodGRP3*-at egy gümöspecifikus *M. truncatula* cDNS-könyvtár tesztelése

TC41363	MKIKPFIFVFFLCSLIITISVIAIRPSKDEKQSCVTEESKTKFLVD..KDGGRGEGGHGDGWGGMHSNVDWETLEQEGF	77
MtN29	MKTKPLIFVFFLCLPLIITISVMAIDSSK...VGETENSKNKIGVE..RVEDGCHNGDHEGGNVDGLFENI IHRMVDKLLG	73
MsnodGRP2B	MKTKSIIISFSFICALVFISVVAIEPSKDEKQFGEIEEFKFK...VSWNRGAWIWPVIVVKCKGGKGGSKGGSGSGGNGG	76
MtnodGRP2B	MKTKSIIISFFVFCALYFISVVAIEPSKDEKQFGEIEEFKFK...VSWNRGAWIWPKYGVKGNKGGKGGSKGGSGSGENGG	76
MsnodGRP2A	MKTKSIIISVFSFICALVFISVVAIESSKDEKQFGEIEEFKFK...VSWRPPGGSWTSHGVRKGGKGGSKGGSGSGENGG	76
MtnodGRP2A	MNTKSIIIFVSFICBLIFISVVAIEPSKDEKQFGEIEEFKFK...VSWRPPGGSWTSHGVRKGGKGGSKGGSGSGENGG	76
TC40868	MKTKHLIFELFICTLMLFISVVAIEOSKNGKQFGATKIVISKVETVPIKPPWGGGWINYG..BKGGAGRKNGEQSGGNRC	77
TC35313	MKIK.MFMFLYFCALLLISVVAIELSKNEKQSCGEAKESKINIEVDGKVRWSSGRATWRSGSGNQNECHNSIINYSDNGK	78
TC41363	GEEPREGGSRGGENGKFGEGEWENEGGGGGEGGEEEEEGFSEYEETGEYP	131
MtN29	GGKRREA..RRGRNRGNWGGNEYSSVRCGYEGPGGEYEGRGEGGWEAGVHEENFERGENEPEPLG	139
MsnodGRP2B	EGGAQGGGQIDGGKDKGSGLDARG...GENNKIGWGYLKN	114
MtnodGRP2B	EGGAQGGGQIEGCKDKGSGLDARGGRGENNNIGWGYLKN	117
MsnodGRP2A	EGGAQGGGQIEGCKDKGSGLDARG	101
MtnodGRP2A	EGGAQGGGQIEGGNDKESGLDGGGGDQIIK	109
TC40868	GKSSQGGGQ.KGGSSENGNEEP	99
TC35313	AGNNENQSGGSQDSGGNRNLGCMNSNVHEKL	110

3. ábra. A GRP2 és hasonló fehérjék összehasonlítása

Az MsnodGRP2A, az MsnodGRP2B, az MtnodGRP2A, az MtnodGRP2B, az MtN29 és a különböző *M. truncatula* EST-kről (TC40868, TC41363, TC35313) származtatott fehérjék párhuzamos összehasonlítását ábrázoltuk. A feltételezett szignálpeptid szekvenciák hasítási helyét nyíllal jelöltük. A legalább négy szekvenciában azonos aminosavakat fekete háttérrel, a hasonlókat szürke háttérrel emeltük ki.

és szisztematikus szekvenálása során a francia munkacsoportban már izolálták (Györgyey és mtsai, 2000). A *Medicago* GRP3 fehérjék aminosavsorrendje a 94%-os hasonlóság mellett 88%-ban azonosnak bizonyult. A GRP3 molekuláris felépítése nagy hasonlóságot mutatott a lucerna NMs22 és a *Vicia* Vfenod-GRP5 fehérje szerkezetéhez (2. ábra). Habár a fehérjék különböző méretűek voltak, mindegyik tartalmazott egy N-terminális szignálpeptidet és ismétlődő glicin- gazdag doméneket. A GRP3 négy doménjével szemben, az NMs22 három domént tartalmazott a WRDWGG oligopeptid motívummal, míg a Vfenod-GRP5 fehérje mindössze két doménje szintén a WRDWGGSFW oligopeptid mintázattal rendelkezett.

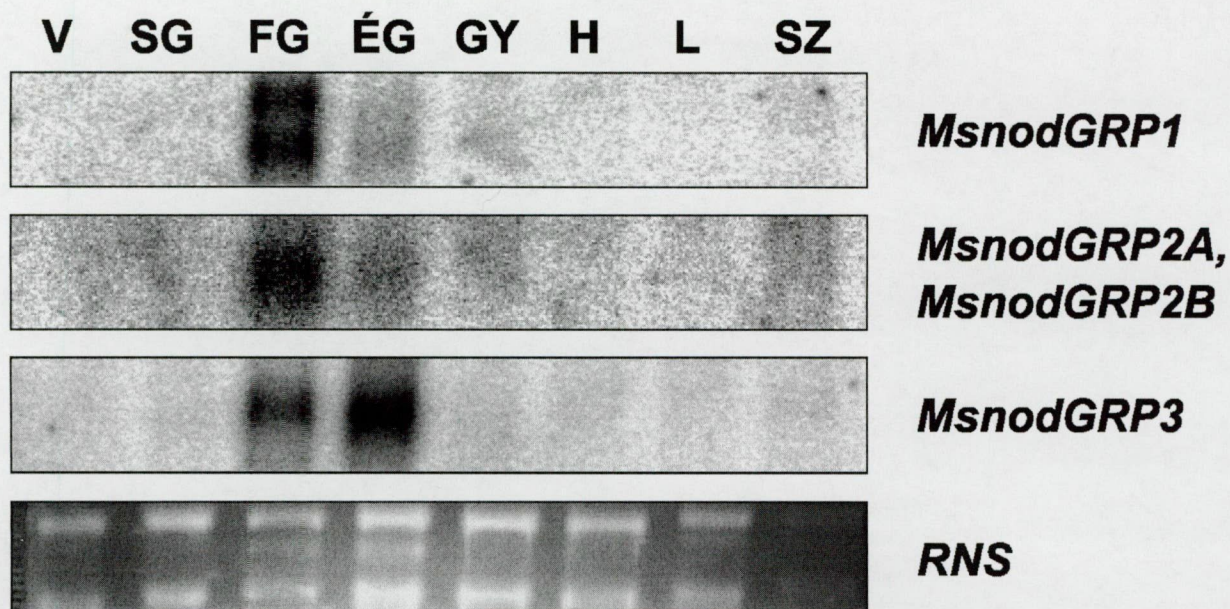
Az MsnodGRP2A és MsnodGRP2B fehérjék hasonlósága a Vfnod-GRP4-hez kisebb mértékűnek bizonyult (62%-os hasonlóság és 43%-os azonosság MsnodGRP2A-val, 64%-os hasonlóság és 46%-os azonosság MsnodGRP2B-vel), míg egymással 85%-os hasonlóságot és

MtnodGRP1A	MKTKLFVSACFYALLLIIFVAIMPSE.....GAIWNGKKGEN	37
MtnodGRP1B	MKTKLFVSVCIFYALLLIIFLVAIMPSE...ACETKKSINIIVHGYANWLGK.....GAIWNGKKGEN	59
MtnodGRP1C	MKTKLFVIFACFYTLICIFLVAIMPFN...AAETKKSINIIEVHGYENWLSRGTILQGGDRNTNEFGYL.....GAIWNGKKGEN	75
MsnodGRP1	MKTKLFVSACFYALLFIIFLVAIMPSEGKQSGVTKKSINIIVHGYANWLGKGAVQDGGKHS.....	61
MtnodGRP1A	IDGFVDGIEGHCGKGYVDNTWKKGPGWTSWW....WCRGGKGGKGGKSGGGYKIPLPVEGKGGGKGGDGKL	108
MtnodGRP1B	IDGFVDGIEGHCGKGYVDNTWKKGPGWTSWW....WCRGGKGGKGGKSGGGYKIPLPVEGKGGGKGGDGKL	130
MtnodGRP1C	NDGCGDIEGHCGKGYIDVTWQKDHTWGRGWWASGGKGGGGKGGKGGGGYKIPLPGGGKGGKGGVDN	148
MsnodGRP1WANVKGSKGTSWWASGGKGGVCAKGDKGGKGGGGYKIPLPVEGKGGGKGL	112

4. ábra. Az MsnodGRP1 és MtnodGRP1-ek aminosavsorrendjének összehasonlítása.

A legalább négy szekvenciában azonos aminosavakat fekete háttérrel, a hasonlóakat szürke háttérrel emeltük ki.

80%-os azonosságot mutattak (3. ábra). Annak a meghatározására, hogy az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* allélikus variánsok-e az idegenbeporzó, tetraploid *M. sativa* genomjában, vagy két különböző génről származnak, egy *M. truncatula* gümős-specifikus cDNS-könyvtárt teszteltünk a lucerna klónokkal. Ennek eredményeként sikerült izolálni a *MtnodGRP2A* és *MtnodGRP2B* klónokat, amelyek bizonyították, hogy ezek a GRP-k különböző gének termékei. Az *MtnodGRP2A* és *MtnodGRP2B* proteinek szignálpeptidjei szignifikáns homológiát mutattak az MtN29 (Gamas és mtsai, 1996) szignálpeptidjéhez, illetve olyan feltételezett glicin-gazdag fehérjékhez, amelyek a *M. truncatula* EST adatbankokban található szekvenciák által lettek meghatározva (*TC40868*, *TC41363*, *TC35313*). Ezek ugyancsak kisméretű fehérjéknek bizonyultak, egy N-terminális szignálpeptiddel valamint az átlagnál magasabb glicintartalommal rendelkeztek. A szignálpeptid szekvenciák között 80%-os homológia értékek voltak, míg a glicin-gazdag régiók csak 60-65%-os hasonlóságot és 30-35%-os azonosságot mutattak. A *M. truncatula* gümős-specifikus cDNS-könyvtár *MsnodGRP1*-gyel való tesztelése során három variánsra találtunk: *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. A szignálpeptidet követő oligopeptid jelen volt a *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C* és *MsnodGRP1* proteinekben, viszont hiányzott a *MtnodGRP1A*-ból, ezzel szemben egy kb 30 aminosav hosszúságú rész



5. ábra. Az *MsnodGRP* gének gümőspezifikus expressziója.

A lucerna virágból (V), spontán gümőből (SG), fiatal (7-napos) gümőből (FG), érett (21 napos) gümőből (ÉG), gyökérből (GY), hipokotilból (H), levélből (L), és szárból (SZ) izolált RNS-sel készített Northern-analízishez az ábra jobb oldalán található hibridizációs próbákat használtuk. Az etidium-bromid festés az RNS tartalom kimutatására szolgált.

mindegyik *MtnodGRP1* középső régiójában megtalálható volt, míg az *MsnodGRP1* nem tartalmazta ezt a szekvenciát (4. ábra).

6.2. Az *MsnodGRP* gének kifejeződésének vizsgálatai

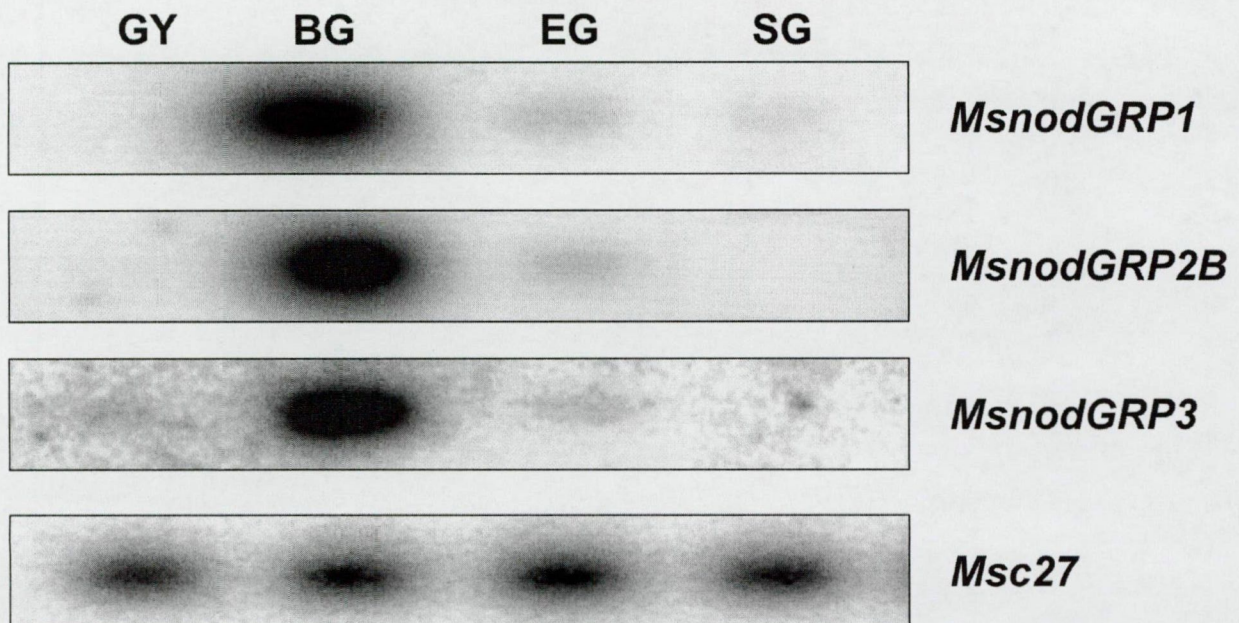
6.2.1. A *GRP*-k szervspecifikus expressziójának analízise

A különböző *GRP* gének expressziós vizsgálatához Northern-analízist alkalmaztunk. Totál RNS-t izoláltunk a lucerna különböző szerveiből: virágból, gyökérből, hipokotilból, levélből, szárból, illetve fiatal (7-napos), érett (21-napos) és spontán gümőből. A különböző

szövetek RNS-ét etídium-bromid festékkel tettük láthatóvá a formaldehid-agaróz tartalmú gélben. A hibridizációk eredményeképpen megállapítottuk, hogy egyik *MsnodGRP* gén sem fejeződött ki virágban, levélben, szárban, hipokotilban, gyökérben vagy spontán gümőben (5. ábra). Ezzel szemben mindegyik *GRP* expresszált a *S. meliloti* által indukált gümőkben. Az *MsnodGRP1*, illetve az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* gének főleg a fiatalabb gümőkben fejeződtek ki, míg az *MsnodGRP3* transzkripció aktivitása folyamatosan nőtt a gümőfejlődés során. Az *MsnodGRP1* hibridizációs próba két különböző nagyságú transzkriptumot jelzett, melyek közül a kisebbik felelt meg az *MsnodGRP1* cDNS méretének. A nagyobbik RNS származhat egy másik, nagyon hasonló gén működéséből, habár a *M. sativa* ssp. *varia* A2 gümőspecifikus cDNS-könyvtár tesztelése során az ugyancsak abundáns, nagyobb méretű RNS-nek megfelelő cDNS nem volt kimutatható. Az is lehetséges, hogy különböző poszttranszkripcionális mechanizmusok (eltérő poliadeniláció, „alternative splicing”) is közrejátszanak az eltérő méretű RNS-ek kialakulásában.

6.2.2. A *Rhizobium*-fertőzés szerepe az *MsnodGRP* gének indukációjában

A Northern-analízissel demonstráltuk, hogy a *GRP* gének valódi nodulin-gének. A spontán gümőkben nem mutatható ki *MsnodGRP* expresszió, ami arra utal, hogy a bakteriális fertőzés elengedhetetlen ezen gének indukációjához. Ennek további bizonyításához, az *MsnodGRP* gének kifejeződését két olyan mutáns *S. meliloti* törzs segítségével vizsgáltuk, amelyek a vad típusú baktériumhoz hasonlóan termelték a Nod-faktort és beindították a gümő kialakulását, viszont a baktérium-invázió, illetve a bakteroid-differenciáció folyamatában elérést mutattak. Az AK1492 vonal a *S. meliloti* 41-es törzs dupla mutánsa, mely nem képes vad típusú exopoliszaharidot (EPS), illetve kapszuláris poliszaharidot termelni, így nem képes



6. ábra. Az *MsnodGRP* gének expressziójának változása a *S. meliloti* fertőzés hatására.

Az RT-PCR analízist a lucerna gyökeréből (GY), Bac⁻ gümőből (BG), Exo⁻ gümőből (EG) és spontán gümőből (SG) izolált RNS-ből szintetizált cDNS-ek, *MsnodGRP*-kre specifikus pimerek és az ábra jobb oldalán jelzett hibridizációs próbák segítségével készítettük el.

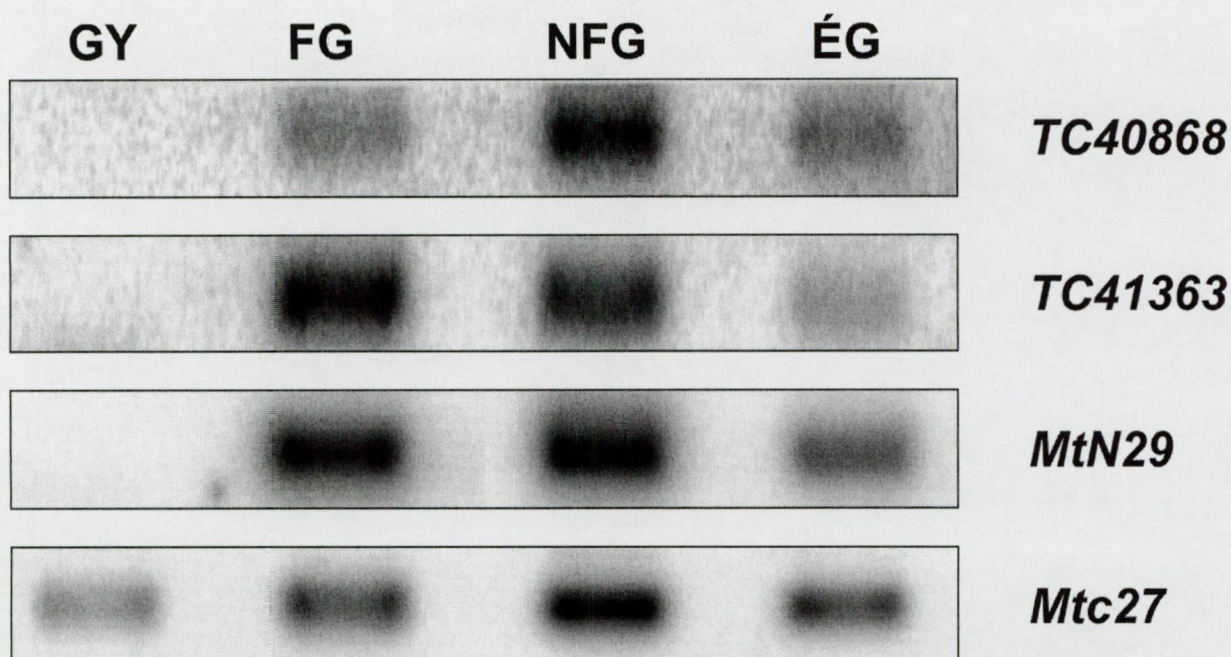
a gümők inváziójára (Exo⁻Kps⁻Inf⁻ mutáns). A másik, a *bacA* génben mutáns 8368-as törzs ugyan termel vad típusú poliszaharidokat, de az inváziót követően nem képes bakteroiddá differenciálódni (Bac⁻). Az AK1492 baktérium által indukált gümőkben mindegyik *MsnodGRP* gén kifejeződése drasztikusan redukálódott, míg a Bac⁻ gümőkben a *GRP* gének működése nem változott (6. ábra). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az *MsnodGRP* gének indukcióját bakteriális poliszaharid kontrolálja és/vagy *Rhizobium*-invázió szükséges a gének kifejeződéséhez.

6.2.3. Az egyéb *GRP*-k indukciójában szerepet játszó faktorok hatása a *MsnodGRP* génekre

Számos vizsgált *GRP* gén esetében kimutatták, hogy különböző kémiai, fizikai és biológiai faktorok hatására megváltozhat expressziójuk. Ezért az *MsnodGRP* géneket is teszteltük, hogy kiderítsük, vajon a *Rhizobium* indukció mellett más hatások is befolyásolják génjeik működését. A lucerna gyökerét különböző anyagokkal kezeltük, illetve eltérő környezeti tényezők között növesztettük. Naftil-ecetsavval (NAA), abszciszinsavval (ABA), gibberelinsavval (GA_3) és kinetinnel, illetve stressz-körülmények között, hősokkal ($37^\circ C$), hidegsokkal ($4^\circ C$), hipoxiával ($+H_2O$) és szárítással ($-H_2O$) kezeltük a lucerna gyökereket. A gyökerekből RNS-t izoláltunk, majd ebből cDNS-t készítve RT-PCR segítségével vizsgáltuk az *MsnodGRP* gének expressziójának esetleges változását. Az eredmények az mutatták, hogy az alkalmazott kezelések nincsenek hatással egyik *GRP* gén indukciójára sem, így tovább erősítik a vizsgált *GRP*-k gümőspezifikus szerepének valószínűségét.

6.2.4. Az *MsnodGRP2A*-hoz és *MsnodGRP2B*-hez hasonló *M. truncatula* gének gümőspezifikus expressziója

Habár a *M. truncatula* *TC40868*, *TC41363* EST-kről átíródó, illetve az *Mtn29* fehérje csak a szignálpeptid régióban mutatott hasonlóságot az *Ms/MtnodGRP2* proteinekhez, a viszonylag magas glicin tartalmuk miatt megvizsgáltuk génjeik kifejeződését. *M. truncatula* R-108-as ökotípusú növény különböző fejlődési állapotban lévő gümőiből és Nod-faktorrall kezelt gyökérből RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk. Specifikus oligonukleotid primereket használva a génekhez tartozó cDNS fragmenteket felsokszorozítottuk, majd a megfelelő próbákkal Southern analízist végeztünk (7. ábra). Az eredmények alapján



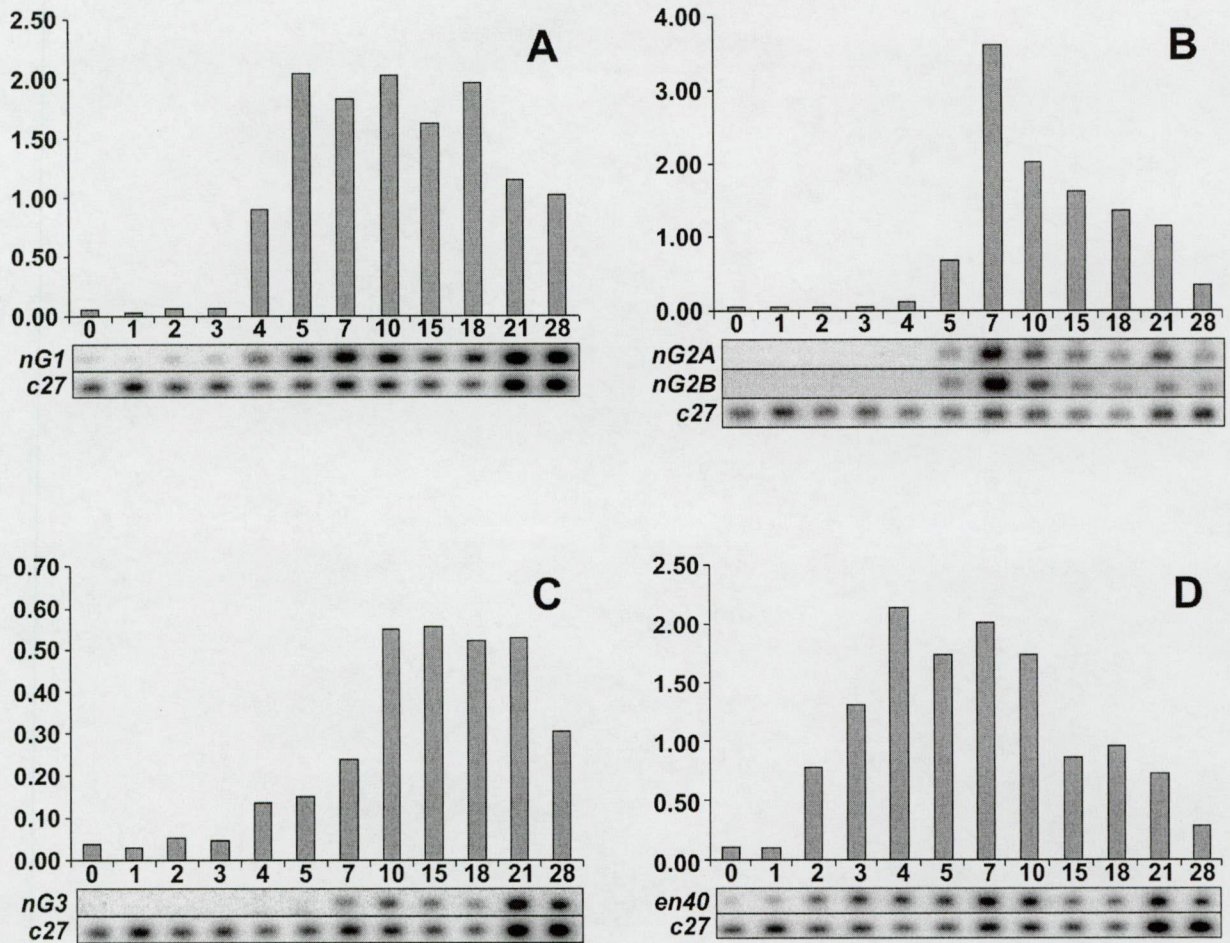
7. ábra. A GRP2 szekvenciához hasonló *M. truncatula* gének expressziója a gümőkben.

A *TC40868*, *TC41363* és *MtN29* gének expresszióját *M. truncatula* R-108-as növény gyökeréből (GY), fiatal (9 napos) gümőjéből (FG), nitrogénfixáló (21 napos) gümőjéből (NFG) és érett (29 napos) gümőjéből (ÉG) izolált RNS-ből készített cDNS-ek specifikus primerekkel végzett amplifikációjával vizsgáltuk. A felhasznált hibridizációs próbákat az ábra jobb oldalán jelöltük.

megállapítható volt, hogy egyik gén sem fejeződik ki gyökérben, míg mindegyik indukálódik a gümőfejlődés során. A *TC40868* esetében a legmagasabb expresszió a már nitrogénfixáló gümőben volt, míg a *TC41363* génje fiatal gümőben fejeződött ki erősebben. Az *MtN29* expressziója fiatal és nitrogénfixáló gümőben is hasonlóan alakult. A gümő öregedése során mindhárom vizsgált *GRP* gén expressziója csökkent.

6.2.5. Az *MsnodGRP* gének kifejeződésének időbeli alakulása a gümőben

A *GRP* gének gümőfejlődés során kifejtett indukciójának részletes kinetikáját RT-PCR



8. ábra. Az *MsnodGRP* gének és az *Msenod40* expressziós kinetikája a gümőfejlődés során.

Az RT-PCR analízishez a cDNS-t a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 18, 21, 28 napos gyökérből illetve gümőből izolált totál RNS-ből készítettük. A PCR reakcióhoz specifikus primerket használtunk (A.) *MsnodGRP1*-hez (*nG1*), (B.) *MsnodGRP2A*-hoz és *MsnodGRP2B*-hez (*nG2A* és *nG2B*), (C.) *MsnodGRP3*-hoz (*nG3*), illetve (D.) *Msenod40*-hez (*en40*). A hisztogramok az *Msc27* (*c27*) hibridizációs jelének intenzitásához mért normalizált állapotot mutatnak.

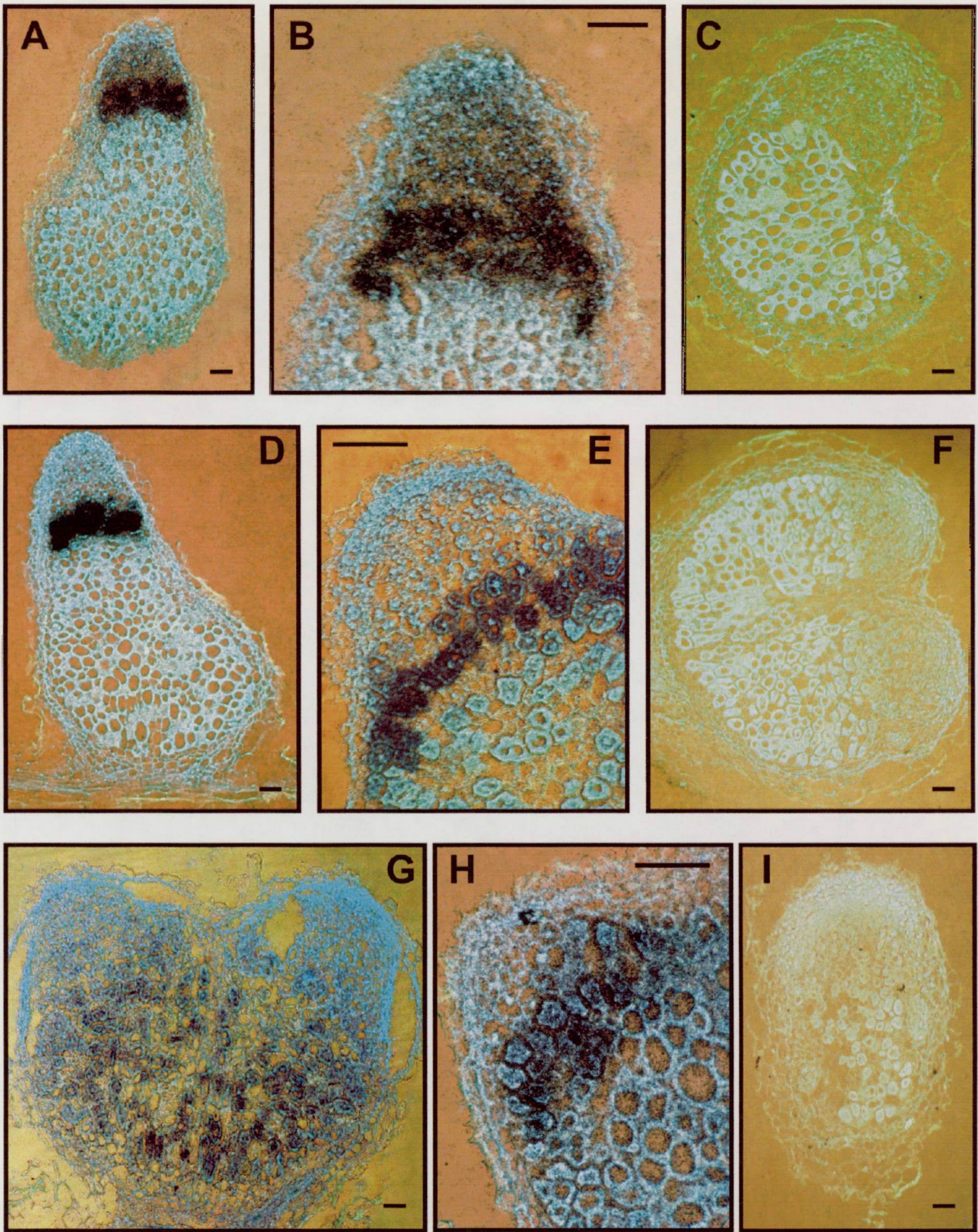
kísérletekkel vizsgáltuk. RNS-t izoláltunk steril, nitrogénmentes körülmények között növesztett növények gyökérből, illetve *S. meliloti*-val inokulált 0-3 napos gyökérből, 4-5 napos gümő-primordiumból, 7-10 napos fiatal gümőből és 15-28 napos érett gümőből, majd ezekből a mintákból cDNS-t szintetizáltunk. A *GRP*-mRNS-ek akkumulációját megmértük és normalizáltuk a konstitutív *Msc27* expressziójához viszonyítva, amely megmutatta a

különböző minták cDNS tartalmát (8. ábra). A gümőfejlődés kontrolljaként egy korai-nodulin gén, az *Msenod40* expresszióját is vizsgáltuk (8D. ábra). A gyökérben detektált gyenge háttérjel 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 (8A. ábra). Az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* esetében nem volt expresszió a gyökérben, a gének indukciója az 5 napos gümőben kezdődött (1 nappal később mint az *MsnodGRP1*), majd a 7 napos gümőben elérte maximumát (8B. ábra). A gümő-organogenezis további szakaszaiban az *MsnodGRP2* gének expressziója erőteljesen lecsökkent. Az *MsnodGRP3* génje csak a 7 napos gümőben indukálódott, viszont aktív maradt a gümőfejlődés későbbi, ténylegesen nitrogénfixáló szakaszaiban is (8C. ábra). Ha összehasonlítjuk az *MsnodGRP*-k expresszióját, akkor láthatjuk, hogy az *MsnodGRP1* két nappal, az *MsnodGRP2*-k három nappal, az *MsnodGRP3* pedig 5 nappal később indukálódik, mint az *Msenod40*, amelyik a fertőzés utáni második napon már expresszál.

6.2.6. Az *MsnodGRP* gének expressziójának térbeli mintázata a gümőn belül

In situ hibridizáció módszerét választottuk, hogy meghatározhassuk a *GRP* gének térbeli kifejeződését a gümőkben. Szensz és antiszensz RNS-próbákat szintetizáltunk a különböző *MsnodGRP*-cDNS-ekre jellemző glicin-gazdag régiók felhasználásával. Az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* esetében egy közös, specifikus próbát használtunk. A hibridizációhoz felhasznált metszeteket eltérő fejlettségi állapotú lucerna-gümőkől készítettük, hogy az organogenezis minden állapotát vizsgálhassuk.

Az *MsnodGRP1* transzkriptumát a gümőcsúcsban, a II-es zónában detektáltuk, míg a nitrogénkötő, III-as zónában nem volt jelen (9A. ábra). A II-es zónán belül, azok a sejtek



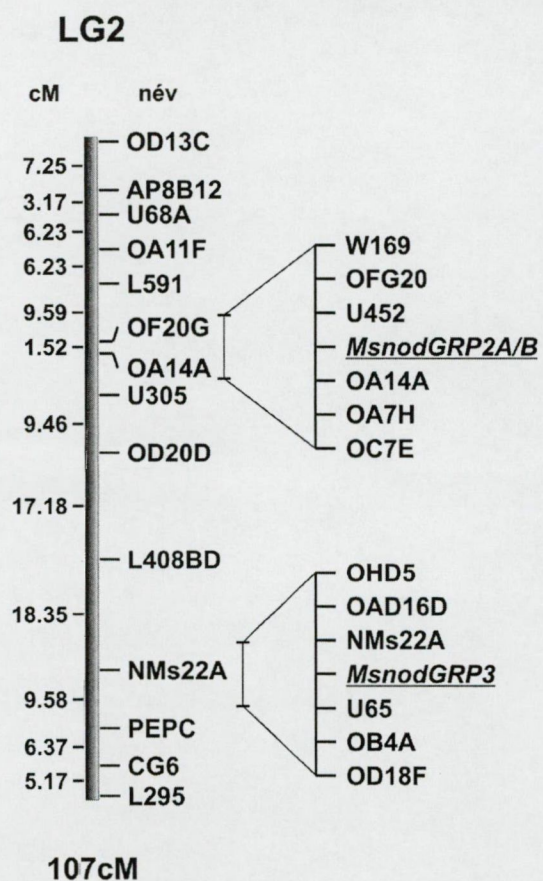
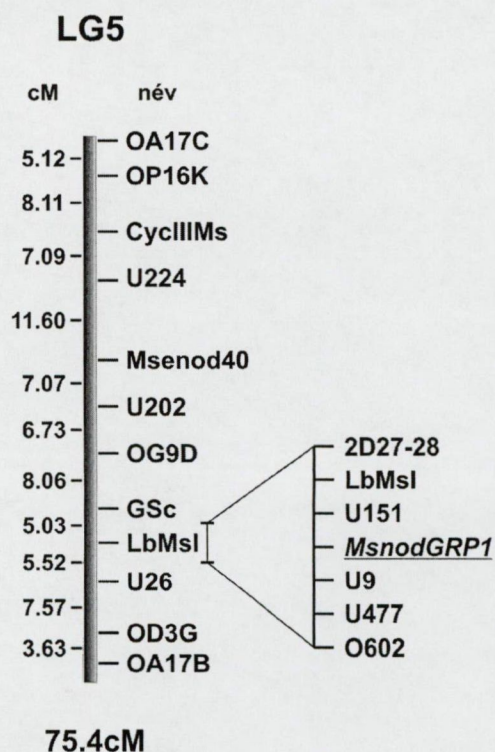
9. ábra. Az *MsnodGRP* transzkriptumok lokalizációja *M. sativa* gumókben *in situ* hibridizáció segítségével. Az antiszensz hibridizációs próbák specifikusak voltak az *MsnodGRP1*-re (A. és B. alpont), *MsnodGRP2*-re (D. és E. alpont) és *MsnodGRP3*-ra (G. és H. alpont). A szensz hibridizációs próbák negatív kontrollként szolgáltak *MsnodGRP1*-re (C. alpont), *MsnodGRP2*-re (F. alpont) és *MsnodGRP3*-ra (I. alpont). A nagyságmérték 200 μ m-t jelez minden esetben.

expresszálták legmagasabban az *MsnodGRP1*-et, amelyek a II-III-as interzónához közel helyezkedtek el, vagy magában az interzónában (9B. ábra). Az *MsnodGRP2* gének kizárólag a II-III-as interzónában fejeződtek ki (9D. ábra), azon belül is főleg egy sejtrétegben (9E. ábra). Az *MsnodGRP3* a gümöcsúcsban nem expresszált, főként a nitrogénkötő sejtekben fejeződött ki (9G. ábra). Néhány esetben azonban a hibridizációs jel erősebb volt a korai szimbiotikus zónában, mint az késői III-as zóna sejtekben (9H. ábra). A szensz RNS-próbákkal végzett kísérletek nem mutattak hibridizációs jelölést (9C. ábra, 9F. ábra, 9I. ábra). Ezek a negatív eredmények és az eltérő expressziós mintázatok bizonyították, hogy a különböző hibridizációs jelek specifikusak voltak mindegyik *MsnodGRP*-re.

6.3. A különböző *GRP* gének genetikai térképhelyének meghatározása

A magyar munkacsoportban elkészítették a lucerna részletes genetikai térképét (Kaló és mtsai, 2000). A genetikai térkép két diploid lucerna alfaj (*M. sativa* ssp. *quasifalcata*, *M. sativa* ssp. *coerulea*) keresztezéséből létrejött F1 növények egyik egyedének önbeporzásából származó F2 szegregáló populáció egyedeinek genetikai analízisével készült. Főleg molekuláris markerek segítségével meghatározták az F2 növények genotípusát több mint 1500 lókuszra és összeállították a *M. sativa* kapcsoltsági térképet, melynek nyolc kapcsoltsági csoportja megfeleltethető a lucerna haploid kromoszóma-készletének.

A különböző molekuláris térképezési módszerek közül az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technikát alkalmaztuk. Az F2 egyedek genomi DNS-ét EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztettük és blottoltuk, majd a különböző *MsnodGRP*-cDNS-ekből készített próbákkal hibridizáltuk. A szegregáló populáció növényeinek genotípusai segítségével meghatároztuk a *GRP* gének elhelyezkedését a kapcsoltsági csoportokban

A**B**

10. ábra. Az *MsnodGRP* gének elhelyezkedése a kapcsoltsági csoportokban.

A kapcsoltsági csoportok megszerkesztéséhez néhány váz-markert használtunk fel, melyek egy részét RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markerek alkották (Kaló és mtsai, 2000). A kapcsoltsági csoportok jobb oldalán jelöltük a markerek neveit, bal oldalán a markerek közötti genetikai távolságot centimorganban (cM) megadva. Az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* gének az *U452* és *OA14A* RAPD markerek között, az *MsnodGRP3* gén a homológ *NMs22A* gén és *U65* RAPD marker között helyezkedik el a 2-es kapcsoltsági csoportban (LG2) (A. alpont). Az *MsnodGRP1* génjét az *U151* és *U9* RAPD markerek határolják az 5-ös kapcsoltsági csoportban (LG5) (B. alpont).

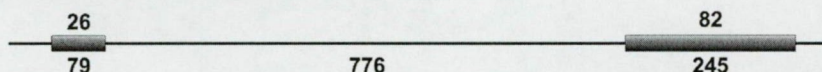
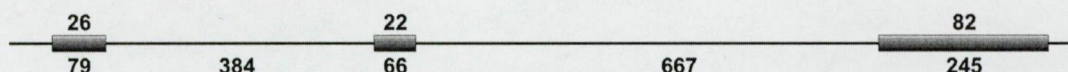
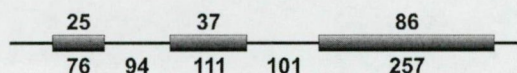
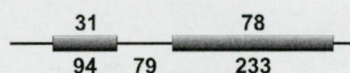
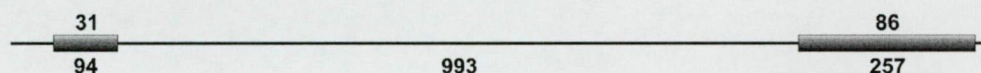
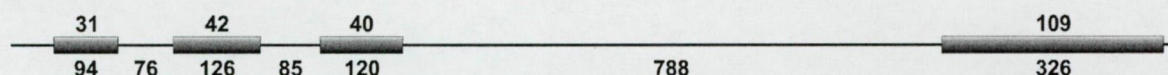
(10. ábra). Az *MsnodGRP1* génje a 75.4 cM (centimorgan) hosszúságú 5-ös kapcsoltsági csoportban (LG5) található (10B. ábra), míg az *MsnodGRP2A*, *MsnodGRP2B* és *MsnodGRP3* gének a 107 cM nagyságú 2-es kapcsoltsági csoportba (LG2) térképeződtek (10A. ábra). Bár az *MsnodGRP2* gének és az *MsnodGRP3* gének ugyanabban a kapcsoltsági csoportban

találhatóak, egymástól nagy fizikai és genetikai távolságban (kb 45-46 cM) helyezkednek el. Az *MsnodGRP2A* és *MsnodGRP2B* gének között nem tudunk kimutatni genetikai távolságot. Az *MsnodGRP3*-hoz ugyancsak nagyon közeli genetikai távolságban helyezkedik el (1 cM-on belül) az egyik homológ génnek, az *NMs22*-génnek az egyik lókusza, az *NMs22A* (10A. ábra). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a kis genetikai távolság viszonylag kis fizikai különbséget takar, vagyis a két gén esetleg egy közös „cluster”-ban helyezkedik el. Az *MsnodGRP1* géntől legalább 1 cM távolságban található egy másik fontos nodulin-gén, a leghemoglobin egyik lókusza, az *LbMsI* (10B. ábra).

6.4. Az *Medicago GRP* gének molekuláris szerkezetének vizsgálata

Az *MsnodGRP* gének részletes vizsgálatához a genomi DNS izolálására volt szükség. Mivel megfelelő minőségű *M. sativa* genomi klónokat tartalmazó könyvtár nem állt rendelkezésre, ezért a közeli rokon faj, a *M. truncatula* genomiális DNS-éből készített, molekulárisan könnyen kezelhető és nagyméretű klónokat (50-200 kilobázis) tartalmazó, BAC (Bacterial Artificial Chromosome) könyvtárat használtuk a *nodGRP* gének izolálására (Nam és mtsai, 1999).

A BAC-filtereket a különböző *MsnodGRP*-cDNS-ekkel hibridizáltuk, melynek eredményeként 10 klónt találtunk pozitívnak, az *MsnodGRP1*-hez négy klón (26C20, 35J3, 48I24, 65F15), az *MsnodGRP2A/B*-hez is négy klón (11K5, 27M14, 79F4, 79F11), míg *MsnodGRP3*-hoz két klón (13P2, 40D15) tartozott. A DNS izolálás után mindegyiket megemésztettük EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel, majd a megfelelő próbákkal visszahibridizáltunk. Az emésztési és hibridizációs mintázat alapján megállapítottuk, hogy az *MsnodGRP2A/B*-nek megfelelő négy klón és az *MsnodGRP3*-hoz tartozó két klón átfedi

A***MtnodGRP1A* (48I24, 65F15)*****MtnodGRP1B* (26C20, 35J3)*****MtnodGRP1C* (48I24, 65F15)****B*****MtnodGRP2A* (11K5, 27M14, 79F4, 79F11)*****MtnodGRP2B* (11K5, 27M14, 79F4, 79F11)****C*****MtnodGRP3* (13P2, 40D15)**

11. ábra. Az *MtnodGRP* gének szerkezete.

A gének exonjait vastaggal kiemeltük, az exon-intron viszonyokat méretarányosan ábrázoltuk, a génekhez tartozó BAC-klónok kódját megadtuk. A gének alatt az exonok és az intronok nagyságát bázispárban megadva jelöltük, a gének felett az exonok által kódolt aminosavak számát ábrázoltuk. Az *MtnodGRP1A* génje kettő, míg az *MtnodGRP1B* és az *MtnodGRP1C* génje három exont tartalmazott (A. alpont). Az *MtnodGRP2* gének egyaránt két exonra oszlottak (B. alpont). Az *MtnodGRP3* volt a legnagyobb méretű gén, négy exont különíthettünk el (C. alpont).

egymást, míg az *MtnodGRP1* által megjelölt négy klón közül csak két-két klón, 26C20 és 35J3, illetve 48I24 és 65F15 tartalmaz átfedő szekvenciákat. Ezek alapján szubklónoztuk a

26C20 és a 48I24 klónokat az *MsnodGRP1*-hez, a 79F4-et az *MsnodGRP2A/B*-hez, illetve a 13P2-t az *MsnodGRP3*-hoz tartozó *M. truncatula* genomi szekvenciák meghatározásához. A szubklónozások és szekvenálások eredményeképpen *MsnodGRP1*-hez három gén, *MsnodGRP2A/B*-hez két gén, *MsnodGRP3*-hoz pedig egy gén tartozott (11. ábra). Az *MsnodGRP1* *M. truncatula* homológjai közül a már korábban leírt *MtnodGRP1A* és *MtnodGRP1C* génje a 48I24-en, míg az *MtnodGRP1B* gén a 26C20-on helyezkedett el. Az *MsnodGRP2A/B* ortológjai, az *MtnodGRP2A* és az *MtnodGRP2B* génjei ugyanazon a BAC-klónon, a 79F4-en voltak megtalálhatóak. Az *MtnodGRP3* (*MsnodGRP3* ortológ) génje egy kópiát tartalmazott a 13P2-n.

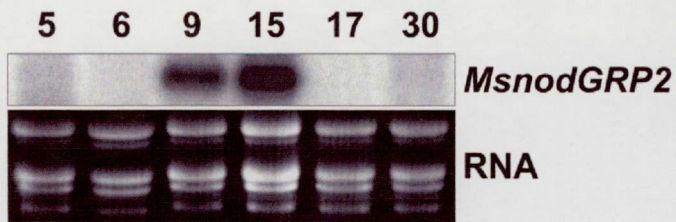
Az *MtnodGRP1* gének szerkezetileg két vagy három exonra oszlottak attól függően, hogy tartalmazták-e a szignálpeptidet követő, középső fehérje szakaszt (11A. ábra), míg az *MtnodGRP2* gének két exont határoztak meg (11B. ábra). Az *MtnodGRP3* kivételével mindegyik *GRP* génre jellemző volt, hogy az utolsó exon tartalmazta a glicin-gazdag domén szekvenciáját. Továbbá mindegyik *MtnodGRP* (ez az *MtnodGRP3* esetében is igaz) első exonja szinte kizárólag a szignálpeptidet meghatározó szekvenciát hordozta. A speciálisabb, repetitív felépítésű *MtnodGRP3*-cDNS-t kialakító gén szerkezetére ugyancsak jellemző volt a repetíciók tagolódása, a második exon tartalmazta *MtnodGRP3* fehérje első repetitív doménjét (42 aminosav), a harmadik exon a második ismétlődő oligopeptidet (40 aminosav), az utolsó exon pedig a harmadik és negyedik repetíciót (42-42 aminosav) (1. ábra). A TATA-box szekvenciáktól 5' irányban elhelyezkedő, kb 300 bázispár hosszúságú, promóterként prediktálható DNS-szakasz legalább 90%-ban azonosnak bizonyult a három *MtnodGRP1* gén, illetve a két *MtnodGRP2* gén összehasonlításában, ami az általuk kódolt nodGRP-k hasonló szabályozását sejteti. Az *MtnodGRP2B* génben található, viszonylag nagyméretű (993 bázispár hosszúságú) intron kb. 300 bázispáros szakasza erős (83%-os) homológiát mutatott a másik sokat vizsgált nodulin-gén, az *Msenod40* promóter szekvenciájához (Fang és Hirsch,

1998), mely DNS-szakasz esetleg gümőspecifikus promóteraktiváló enhanszereként működhet.

6.5. Az *MsnodGRP*-k funkcionális vizsgálata antiszensz technika segítségével

Transzgenikus növényben egy gén expressziójának megváltoztatása (növelés/szensz, csökkentés/antiszensz kifejeztetés) következtében kialakuló fenotípus utalhat a gén funkciójára. Ezért *M. truncatula* növényekben a géntermékek dózist csökkentő antiszensz transzformáció segítségével próbáltuk vizsgálni az abundánsan kifejeződő *MsnodGRP*-k gümőzésben betöltött szerepét. Az *MsnodGRP1* és *MsnodGRP2A* cDNS-ek egy szakaszát antiszensz orientációban klónoztuk 35S virális promóter mögé, BASTA-herbicid rezisztenciával rendelkező bináris növényi vektorokba. A plazmidokat ezután bejuttattuk *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe, mellyel a *M. truncatula* R-108-as vonalát transzformáltuk (Trinh és mtsai, 1998).

MsnodGRP1 esetében 24, *MsnodGRP2A*-val pedig 30 elsődleges transzformánst kaptunk, amit Southern és Northern hibridizációval analizáltunk. Annak meghatározására, hogy az *A. tumefaciens* T-DNS-e hány példányban épült be a növényi genomba, a különböző egyedekből DNS-t izoláltunk, a DNS-t EcoRI és HindIII enzimekkel megemésztettük, majd hibridizáltuk a megfelelő *MsnodGRP1* és *MsnodGRP2A* próbákkal. Ennek alapján mind az *MsnodGRP1*, mind az *MsnodGRP2A* esetében hat független vonalat találtunk, melyeket tovább vizsgáltunk. Mivel az *MsnodGRP*-k nem expresszálnak vad típusú levélben (5. ábra), ezért az antiszensz-*nodGRP* expressziót a transzgenikus növények levelében teszteltük Northern-analízissel. Kettő, az *MsnodGRP2A*-t magas szinten expresszáló vonalat találtunk

A**B**

12. ábra. Antiszensz expresszió a transzgenikus növényekben.

A. A Northern-analízis során az *MsnodGRP2* T0 generációjának hat független vonalát (egyed számmal jelölve) a cDNS-próbával hibridizáltuk, az RNS-ek minőségét az RNS-gél etídium-bromid festésével ellenőriztük.

B. Az ábra bal oldalán a transzgenikus, jobb oldalán a vad típusú gyökereket és gümőket (nyíl) láthatjuk. A transzgenikus, Fix^- (nem nitrogénkötő) gümők barnás színűek, szemben a Fix^+ , rózsaszínű, normálisan fejlődött gümőivel.

(12A. ábra), melyekről azt gondoltuk, hogy a levélben mért expresszió alapján szupresszálhatják a gümő endogén *nodGRP* aktivitását. Ezekből a növényekből származó T1 generációk gümőképzésének fenotipikus változásait ún. „nodulációs-tesztkamrában” (nodule-factory) vizsgáltuk, amely optimális körülményeket biztosít nodulációs kinetika, gümőszám és növényfejlődés elemzéséhez egyaránt, illetve a növényeken bekövetkező változásokat szemmel is nyomon követhetjük, anélkül, hogy megzavarnánk fejlődésüket.

Nitrogénszegény környezetben a T1 generációk nagy része normális gümőfejlődést mutatott, kivéve három egyedet, melyek az *MsnodGRP2/15*-ös T0 vonalból származtak és legmagasabban expresszálták az *MsnodGRP2A* antiszensz-cDNS-t (12A. ábra). Ezeken a

növényeken a gümőfejlődés valószínűleg a nirtogénkötő sejtek differenciálódásánál leállt, a gümők a gömbszerű formában maradtak, sőtét színük pedig a szenescenciára, elhalásra utalt (12B. ábra). A gümő-organogenezis sérülése nem befolyásolta az egyéb növényi szervek fejlődését, a növények nem mutattak más fenotipikus változást a vad típushoz képest, ami arra utalt, hogy az antiszensz szuppresszió csak a gümőfejlődés során fejt ki hatását. Az antiszensz hatás ellenőrzésének érdekében ezeket a növényeket újra magasabb nitrogéntartalmú közegbe helyeztük, majd a tőlük származó T2 generációkat is teszteltük a gümőképzés folyamatára. Sajnos ezekben a növényekben nem találtunk Fix⁻ fenotípust hordozó egyedeket, mindegyik növény normális nodulációt mutatott, így az újabb generáció segítségével nem tudtuk bizonyítani, hogy az antiszensz-expresszió összefüggésbe hozható gümőzés folyamatában bekövetkezett változással.

7. Az eredmények megvitatása

A dolgozat témájaként *M. sativa* és *M. truncatula* növények gümőiben kifejeződő különböző, glicinben gazdag fehérjéket kódoló cDNS-ek izolálását és jellemzését választottuk. Ezek a fehérjék az egyéb GRP-khez hasonlóan sejtmembránon keresztüli transzportot irányító szignálpeptidet és glicin-gazdag domént tartalmaznak. Ezzel szemben ez a glicintartalom alacsonyabbnak bizonyult (20-30%-os), mint az egyéb GRP-k esetében, ahol ez az érték meghaladhatja a 80%-ot. Mindezek ellenére ez a glicintartalom mégis szignifikánsan magasabb, mint az egyéb, nem glicin-gazdag fehérjékben, tehát helytálló az elnevezés. 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 kisméretű fehérje, melyből hiányzik az a tipikus glicin-gazdag repetitív motívum, ami jellemzi szinte az összes, nem-gümőspecifikus GRP-t (Sachetto-Martins és mtsai, 2000). Csak néhány GGX szekvenciából álló ismétlődés található bennük. Az *MsnodGRP3* fehérje az egyetlen, amelynek szerkezete nagyobb ismétlődésekből áll, azon belül is egy WRDWGGSFW mintázattal. Ebben a tulajdonságban nagyon hasonlít két másik gümőspecifikus protein, az *NMs22* (Ganter és mtsai, 1998) és a *Vfenod-GRP5* (Schröder és mtsai, 1997) elsődleges szerkezetére, csak a repetíciók száma változó. A *M. truncatula* EST adatbázisban található, az *NMs22* homológjának prediktált *TC40954* által kódolt fehérje (*NMt22*) ugyancsak két repetíciót hordoz, mint a *Vfenod-GRP5*. Ezek az eltérések azt sugallják, hogy bár homológjai molekuláris szerkezetükben sokban hasonlítanak az *MsnodGRP3* proteinre, mégis eltérő funkcióval rendelkezhetnek. Ráadásul az *MsnodGRP3* szignálpeptidje szignifikáns homológiát mutat egy másik pillangós növényből, a *Trifolium repens*-ből izolált DD17-es nodulinnal (acsession no: CAC84521), melynek

szekvenciája nemrég került az adatbázisokba, és 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. A fehérjék gyenge homológiát mutatnak a Vfnod-GRP4-hez, azzal együtt, hogy a lucerna fehérjék tartalmaznak szignálpeptidet, míg a *Vicia* protein nem. Ezzel szemben épp ezek a szignálpeptidek mutatnak magas homológiát három, *M. truncatula* EST-k (TC40868, TC41363, TC35313) által reprezentált proteinhez. Ezek a fehérjék ugyancsak glicin-gazdag doménnal rendelkeznek, viszont ez a régiójuk nem homológ sem az Ms/MtnodGRP2-k szekvenciájához, sem egymáshoz. Az egyik ilyen rokon fehérje az MtN29, amit ugyancsak nodulinként jellemeztek (Gamas és mtsai, 1996). Ezenkívül még a borsóban (*Pisum sativum*) korai-nodulinként leírt Enod7 (acsession no: CAA63660) is a szignálpeptid-homológok közé sorolható, viszont a többivel ellentétben ennek a fehérjének a glicintartalma meglehetősen alacsony.

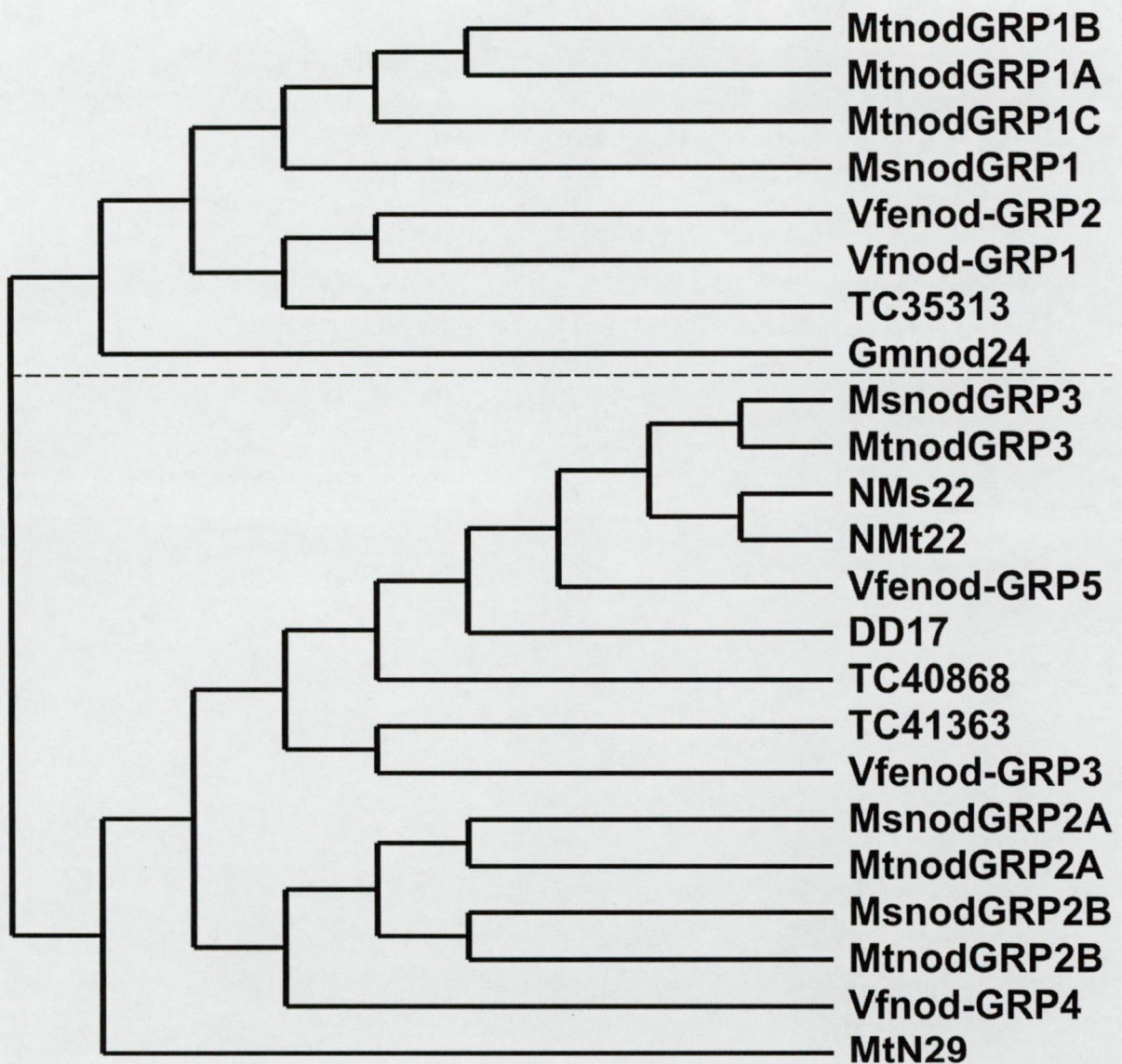
Az MsnodGRP1 az egyetlen olyan GRP, mely semmi eddig ismert fehérjéhez nem mutat homológiát. A *M. truncatula* gümőspecifikus könyvtárak tesztelése során izolált három homológ klón nem a valódi, ortológ párjai a lucerna klónnak. A homológ részeket a fehérje szignálpeptid és a karboxiterminális glicin-gazdag régiója képezi, míg a centrális régiók kevésbé konzerváltak (4. ábra).

A különböző *nodGRP* gének genomi szekvenciájának vizsgálata megmutatta, hogy néhány hasonlóság a génjeik molekuláris szerveződésére is jellemző. Mindegyik *nodGRP* gén első exonját főleg a szignálpeptid szekvenciája alkotja, míg az utolsó exon a *MtnodGRP1* és *MtnodGRP2* géneknél a glicin-gazdag domént foglalja magába. Ettől csak a speciálisabb felépítésű, több ismélylődést tartalmazó, MtnodGRP3-at kódoló gén tér el, mely exonjainak szerkezete a repetíciókat követi. A különböző típusú *MtnodGRP*-k feltételezett promóter-

szekvenciáinak különbségei eltérő szabályozásra, hatásmechanizmusra utalnak. Ehhez társul az a tény is, hogy a különböző *MsnodGRP* gének egymástól nagy fizikai és genetikai távolságban helyezkednek el a lucerna kapcsoltsági csoportjaiban, vagyis ha a génjeik eredete valaha közös is volt, korán szétválhatott fejlődésük.

A GRP nodulinok kapcsolatát filogenetikai törzsfán ábrázoltuk, mely két fő csoportra tagolódik (13. ábra). Ahogy az várható, az *MsnodGRP1* és a közeli rokon fehérjék, az *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B* és *MtnodGRP1C* alkotnak egy csoportot. Érdekes módon azon fehérjék (TC40868, TC41363, TC35313), melyek szignálpeptidjei az *Ms/MtnodGRP2*-éhez hasonlítanak a filogenetikai fa távolabbi ágán helyezkednek el. A TC35313 protein inkább a *nodGRP1* fehérjékkel mutat rokonságot, mely csoporthoz távolabbról kapcsolódik még egy a GRP-khez homológiát mutató, szójából izolált nodulin, a *Gmnod24* is (Sandal és mtsai, 1992). 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 alcsaládját, 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, mely korai-nodulin gén a sejtproliferációhoz, a gümő-primordium kialakulásának beindításához



13. **ábra.** A nodGRP-k és rokon fehérjék filogenetikai törzsfája (PHYLIP - <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)

szüksége (Crespi és mtsai, 1994). A 4. napon 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, de főleg a disztális részében, illetve a II-III-as interzónában találhatóak abundáns mennyiségben, míg a III-as zónából hiányoznak. Ez a mintázat jól tükrözi az

expressziós kinetikát, *MsnodGRP1*-nek valószínűleg a szimbiotikus szövetek differenciációjában lehet szerepe. A II-es zónában észlelt expressziós mintázat magyarázza Northern-analízis és az RT-PCR kísérlet által, a gümőfejlődés során kimutatható transzkriptum-szint csökkenést. A gümő növekedésével a III-as zóna tömege is nő, mely magában hordozza a zóna RNS-tartalmának emelkedését is, így a változatlan méretű II-es zóna és a benne expresszált RNS-ek a teljes RNS tartalomhoz képest csökkent mennyiséget mutatnak. A *M. truncatula* homológok (*MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C*) izolálása, felveti a lehetőségét egyéb *MsnodGRP1* homológok létezésének a *M. sativa* gümőben is.

MsnodGRP2A és *MsnodGRP2B* transzkriptumait nem lehet megkülönböztetni Northern hibridizációval, mert a magas homológia miatt a gének kereszthibridizálnak. 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 sejtjei szimbiotikus, nitrogénkötő sejtekké alakulnak. Ezalatt az idő alatt az *MsnodGRP2* transzkriptumok mennyisége az 5-szörösére növekszik, majd a továbbiakban erősen csökken a gének aktivitása. Az *in situ* hibridizációs kísérletek a II-III-as interzónát jelölték meg, ezen belül is igazán csak néhány, 2 vagy 3 sejtréteg expresszálja az *MsnodGRP2* géneket. Ezekben a sejtekben valószínűleg hatványozottan fontos molekuláris változások történnek, melyek a szimbiotikus, nitrogénkötő sejtek végső kialakulásához vezetnek. Ez összhangban van az RT-PCR kísérletek eredményeivel, amelyek megmutatták, hogy az *MsnodGRP2* transzkriptumok mennyisége sokkal nagyobb mértékben csökken a gümőéréssel, mint ahogy ez az *MsnodGRP1* esetében tapasztalható. Az *Ms/MtnodGRP2*-k különböző szignálpeptid-homológjai (TC40868, TC41363, MtN29) ugyancsak gümőspezifikus fehérjék.

A

	gümő-primordium	fiatal-gümő	nitrogénfixáló gümő	érett gümő
<i>MsnodGRP1</i>	+	++	+++	++
<i>MsnodGRP2A/B</i>	-	+++	++	+
<i>MsnodGRP3</i>	-	+	++	++
<i>TC40868</i>	n.v.	+	++	+
<i>TC41363</i>	n.v.	+++	++	+
<i>MtN29</i>	n.v.	++	++	+

B

	merisztéma, I	inváziós zóna, II	átmeneti zóna, II-III	nitrogénkötő zóna, III
<i>MsnodGRP1</i>	-	+	+++	-
<i>MsnodGRP2A/B</i>	-	-	+++	-
<i>MsnodGRP3</i>	-	-	++	++

1. táblázat. A *Medicago* GRP-k kifejeződésének összehasonlító táblázatai

A géneexpressziókat időbeli (A.) és térbeli (B.) összefüggésükben ábrázoltuk (n.v. – nem vizsgált).

Az *MsnodGRP3*-mal végzett kísérletek alapján (Northern, RT-PCR) elmondható, hogy génje a 7. napon indukálódik, de aktivitása megmarad a gümő aktív nitrogénfixáló szakaszában is. Az *in situ* hibridizáció a III-as, nitrogénkötő zónában jelölte meg az *MsnodGRP3* transzkriptumokat, ami egyezést mutat az *MsnodGRP1*-hez és az *MsnodGRP2A/B*-hez képest késleltetett indukcióval, illetve az aktív nitrogénfixáló periódusban tapasztalt magasabb transzkriptum-szinttel. A különböző *Medicago* GRP-k génkifejeződéseinek összefüggését az 1. táblázatban ábrázoltuk.

A *S. meliloti* mutánsok segítségével bizonyítottuk, hogy a *nodGRP* gének expressziója függ a bakteriális fertőzéstől, de független a bakteroid differenciációtól. A *nodGRP*-k eltérő expressziós kinetikája különböző funkciókat sejtet. 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. Az

AtGRP3 a sejt-fal-kapcsolt WAK1 fehérjéhez kötődik, mely a levél-sejtek fejlődésében játszik szerepet (Kohorn, 2001). Amikor a gümőfejlődés során a baktériumok behatolnak a gazdasejtbe, a nodGRP1 és nodGRP2 fehérjék mintegy jelzéseként szolgálhatnak specifikus molekuláris struktúrák (mint pl. peribakteroid membrán) kialakításához. Habár a nodGRP2 proteinek szerepe még ennél is speciálisabb lehet, ami végül a szimbiotikus sejt végleges kialakulásához vezet. 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 gümőspecifikus 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 mutánsbankok készítése még folyamatban van a különböző laboratóriumokban. Ezért a géncsendesítés (gene silencing) másik lehetséges megoldásaként antiszensz növények előállításával kísérleteztünk, hogy megvizsgáljuk vajon a *nodGRP* gén szuppressziója hatással van-e a gümőfejlődésre. A 42 transzformáns T1 növény között 3 egyed Fix⁻ fenotípust mutatott, míg egyéb fenotipikus eltérés nem volt megfigyelhető a növények fejlődése során. A növények gyökerén kialakuló gümő-primordiumok nem voltak képesek nitrogénfixáló gümökké alakulni. Ezek alapján úgy tűnt, hogy a *nodGRP* gén szuppressziója megállíthatja a gümőfejlődést. A T2 generáció növényei azonban normálisan gümöztek, de lehetséges, hogy az antiszensz hatás nem érvényesült többé. Felmerülhet az is, hogy a 35S-promóterrel indukált antiszensz gén nem expresszált konstitutívan a gümőkben. Ezért nem lehet biztosan állítani, hogy az antiszensz transzformánsok elvesztették gümözési képességüket. Mindenesetre biztató jelként értékelhető a T1 generációban kialakult Fix⁻

növények jelenléte, az antiszensz-transzformáció kísérletének ismétlésével megerősíthető lenne az első vizsgálat eredménye. Egyéb lehetséges funkcionális vizsgálati módszerként alkalmazható lenne az RNS-interferencia technikája.

A távlati tervekhez kapcsolódik még a nodGRP fehérjével esetlegesen kölcsönható partner kutatása élesztő kettős hibrid technika segítségével. A genomi szekvenciák izolálásával lehetőség nyílt a gümőspezifikus promóterek részletesebb vizsgálatára, melyek segítenék megérteni a gümőképzés során indukált gének működésének molekuláris mechanizmusát az indeterminált gümőt kialakító pillangósvirágú növényekben.

8. Összefoglalás

A francia és a magyar munkacsoport szoros együttműködésének köszönhetően az elvégzett munkák során megállapítottuk, hogy:

- a *Vicia faba*-ból izolált *GRP* génekhez hasonlóan a *M. sativa* és *M. truncatula* növények is tartalmaznak hasonló *GRP* proteineket;
- a *GRP* fehérjék molekuláris szerkezete eltér a már részletesen jellemzett, magas glicintartalmú *GRP*-k erősen repetitív szerkezetétől;
- a *M. truncatula* EST bankok szekvenciáiról prediktálható fehérjék között is számos hasonló *GRP* található;
- a vizsgált *GRP* gének kizárólagos gümöspecifikus expresszióval rendelkeznek;
- a szimbiotikus partner, *S. meliloti* jelenléte feltétlenül szükséges a *nodGRP* gének kifejeződéséhez;
- az egyéb *GRP* gének expresszióját reguláló biotikus és abiotikus faktorok nem befolyásolják a *nodGRP* gének kifejeződését;
- az vizsgált *nodGRP* gének eltérő transzkripciós aktivitást mutatnak a gümő fejlődése során;
- habár a *nodGRP*-transzkriptumok lokalizációja részben átfedő mintázatot mutat, eltérően expresszálnak a gümő zónáin belül;
- egymástól nagy fizikai és genetikai távolságban helyezkednek el a különböző *nodGRP* gének a *Medicago* genomban;
- a *nodGRP* gének molekuláris szerkezete, szerveződése sok hasonlóságot mutat;
- a *nodGRP*-k funkcionális analízisének tanulmányozására tett kísérlet, az antiszensz növénytranszformáció csak részleges eredménnyel szolgált, mely további vizsgálatot igényel,

illetteb egyeb molekularis módszerek szükségességét hangsúlyozza, melyek segítenék feltárni az abundáns nodGRP-család nodulációban betöltött szerepét.



9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet a francia munkacsoport témavezetőinek, Dr. Kondorosi Évának és Dr. Kondorosi Ádámnak, illetve a magyar munkacsoport témavezetőjének, Dr. Kiss György Botondnak, azért a lehetőségért, hogy csoportjukban dolgozhattam és a doktori dolgozatomat elkészíthettem.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Raskó Istvánnak, az Genetikai Intézet igazgatójának, aki a munkámhoz szükséges feltételeket megteremtette és végig támogatásáról biztosított.

Külön köszönettel tartozom Kondorosi Évának, aki hasznos tanácsaival és észrevételeivel a dolgozat és a dolgozat alapjául szolgáló közlemény elkészítésében igen nagy segítségemre volt.

A dolgozatban közölt eredményeket csak csoportmunkában végzett kutatómunka eredményeképpen érhattük el, ezért köszönettel tartozom régi és jelenlegi kollégáimnak, Dr. José María Vinardell-nek, Dr. Peter Mergaert-nak, Dr. Miguel Redondo-Nieto-nak, Dr. Hanh Trinh-nek, Danièle Vaubert-nek, Dr. Györgyey Jánosnak, Dr. Kiss Ernőnek, Dr. Kelemen Krisztinának és Dr. Kelemen Zsoltnak, akik a francia munkacsoportban végzett tevékenységeimet segítették, illetve Dr. Kereszt Attilának, Dr. Kaló Péternek, Dr. Endre Gabriellának és Kiss Péternek, akik a magyar munkacsoportban készített munkák létrejöttében segédkeztek.

Köszönöm a magyar csoport asszisztenseinek, Jenei Sándornak, Somkuti Pálnának (Gyöngyi), Lengyel Andreának, Laczi Mariannak, Liptay Zsuzsának, Tóth Lászlónának (Mari), az elmúlt évek nélkülözhetetlen és segítőkész munkáját.

És végül, de nem utolsósorban, szeretnék köszönetet mondani családomnak, hogy a mindennapi kutatómunkához nyugodt háttérrel biztosítottak számomra.

10. Irodalomjegyzék

Albrecht, C., Geurts, R., Bisseling, T. (1999) Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.* 18:281-288.

Anderson, C.M., Wagner, T.A., Perret, M., He, Z., He, D., Kohorn, B.D. (2001) WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol. Biol.* 47:197-206.

Barker D.G., Blanchi, S., Blondon, F., Dattee, Y., Duc, G., Essad, S., Flament, P., Gallusci, P., Geiner, G., Guy, P., Muel, X., Tourneur, J., Huguet, T. (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8:40-49.

Bauchrowitz, M.A., Barker, D.G., Nadaud, I., Rouge, P., Lescure, B. (1992) Lectin genes from the legume *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 19:1011-1017.

Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197.

Bladergroen, M.R., Spaink, H.P. (1998) Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:353-359.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., Barker, D. G. (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:695-700.

Caetano-Anollés, G., Joshi, P.A., Gresshoff P.M. (1992) Nodulation in the absence of *Rhizobium*. In: Gresshoff P.M. editor. *Current topics in plant molecular biology , vol 1. Plant biotechnology and development*. Boca Raton, FL: CRC Press 61-70.

Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E. (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.* 104:1015-1025.

Cassab, G.I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:281-309.

Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D, Gough, C., Denarie, J. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12:1647-1666.

Church, G. M., Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.

Coba de la Pena, T., Frugier, F., McKhann, H.I., Bauer, P., Brown, S., Kondorosi, A., Crespi, M. (1997) A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant Journal* 11:407-420.

Condit, C.M. (1993) Developmental expression and localization of petunia glycine-rich protein 1. *Plant Cell* 5:277-288.

Cook, D.R., VandenBosch, K., de Bruijn, F.J., Huguet, T. (1997) Model legumes get the nod. *Plant Cell* 9:275-280

Cretin, C., Puigdomenech, P. (1990) Glycine-rich RNA-binding proteins from *Sorghum vulgare*. *Plant Mol. Biol.* 15:783-785.

Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., Kondorosi, A. (1994) *Enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* 13:5099-5112.

Crespi, M., Galvez, S. (2000) Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:155-166.

de Almeida Engler, J., De Groot, R., Van Montagu, M., Engler, G. (2001) *In situ* hybridization to mRNA of *Arabidopsis* tissue sections. *Methods* 23:325-334.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.

de Oliveira, D.E., Seurinck, J., Inze, D., Van Montagu, M., Botterman, J. (1990) Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2:427-436.

Dreyfuss, G., Swanson, M.S., Pinol-Roma, S. (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* 13:86-91.

Drinkwater, L. E., Wagoner, P., Sarrantonio, M. (1998) Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* 396:262-265.

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.

Fang, Y., Hirsch, A.M. (1998) Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 116:53-68.

Ferullo, J.M., Vezina, L.P., Rail, J., Laberge, S., Nadeau, P., Castonguay, Y. (1997) Differential accumulation of two glycine-rich proteins during cold-acclimation alfalfa. *Plant Mol. Biol.* 33:625-633.

Frugier, F., Kondorosi, A., Crespi, M. (1998) Identification of novel putative regulatory genes induced during alfalfa nodule development with a cold-plaque screening procedure. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:358-366.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dréano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M, Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandebol, M., Vorhölter, F.-J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.-C., Batut, J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668-672.

Gamas, P., Niebel, F.d.C., Lescure, N., Cullimore, J. (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:233-242.

Ganter, G., Raja, S., Dunn, K. (1998) The cDNA sequence of Nms-22 (Accession No. AF030252), a gene whose message is specific to the infected cells of alfalfa (*Medicago sativa*) root nodules. *Plant Physiol.* 116:446.

Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8:1871-1883.

Glazebrook, J., Ichige, A., Walker, G.C. (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* 7:1485-1497.

Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P., Pages, M. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334:262-264.

Goormachtig, S., Lievens, S., Van de Velde, W., Van Montagu, M., Holsters, M. (1998) Srch13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* 10:905-916.

Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., Dudits, D. (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 16:999-1007.

Györgyey, J., Vaubert, D., Jiménez-Zurdo, J.I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:62-71.

Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.

Harrak, H., Chamberland, H., Plante, M., Bellemare, G., Lafontaine, J.G., Tabaeizadeh, Z. (1999) A proline-, threonine-, and glycine-rich protein down-regulated by drought is localized in the cell wall of xylem elements. *Plant Physiol.* 121:557-564.

Heintzen, C., Melzer, S., Fischer, R., Kappeler, S., Apel, K., Staiger, D. (1994) A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant Journal* 5:799-813.

Hirsch, A.M. (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.

Hirsch, A.M., LaRue, T.A. (1997) Is the legume nodule a modified root or stem or an organ *sui generis*? *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:361-392.

Hoffmann, B., Trinh, T., Leung, J., Kondorosi, A., Kondorosi E. (1997) A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:307-315.

Hood, E., Gelvin, S., Melchers, L., Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2:208-218.

Hunt, S., Layzell, D.B. (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 44:483-511.

Jiménez-Zurdo, J.I., Frugier, F., Crespi, M.D., Kondorosi, A. (2000) Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenetic pathways acting in alfalfa nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:96-106.

Kaldenhoff, R., Richter, G. (1989) Sequence of cDNA for a novel light-induced glycine-rich protein. *Nucleic Acids Res.* 17:2853.

Kaló, P., Endre, G., Zimányi, L., Csanádi, G., Kiss, G.B. (2000) Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100:641-657.

Keller, B., Schmid, J., Lamb, C.J. (1989) Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein - β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. *EMBO J.* 8:1309-1314.

Kingsley, P.D., Palis, J. (1994) GRP2 proteins contain both CCHC zinc fingers and a cold shock domain. *Plant Cell* 6:1522-1523.

Kiss, G.B., Vincze, É., Végh, Z., Tóth, G., Soós, J. (1990) Identification and cDNA cloning of a new nodule-specific gene, Nms-25 (nodulin-25) of *Medicago sativa*. *Plant Mol. Biol.* 14:467-475.

Kohorn, B. (2001) WAKs; cell wall associated kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:529-533.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Kondorosi, A. (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti* : Identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193:445-452.

Kouchi, H., Takane, K., So, R.B., Ladha, J.K., Reddy, P.M. (1999) Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant Journal* 18:121-129.

Linthorst, H.J., van Loon, L.C., Memelink, J., Bol, J.F. (1990) Characterization of cDNA clones for a virus-inducible, glycine-rich protein from petunia. *Plant Mol. Biol.* 15:671.

Le, H., Chang, S., Tanguay, R., Gallie, D. (1997) The wheat poly(A)-binding protein functionally complements pab1 in yeast. *Eur. J. Biochem.* 243:350-357.

Maniatis, T., Fritsch E. F., Sambrook, J., (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Marty, I., Monfort, A., Stiefel, V., Ludevid, D., Delseny, M., Puigdomenech, P. (1996) Molecular characterization of the gene coding for GPRP, a class of proteins rich in glycine and proline interacting with membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30:625-636.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R.M., Spalink, H.P., Sautter, C., Rolfe, B.G., Djordjevic, M.A. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant Journal* 14:23-34.
- Memelink, J., Linthorst, H.J., Schilperoort, R.A., Hoge, J.H. (1990) Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* 14:119-126.
- Molina, A., Mena, M., Carbonero, P., García-Olmedo, F. (1997) Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. *Plant Mol. Biol.* 33:803-810.
- Mousavi, A., Hiratsuka, R., Takase, H., Hiratsuka, K., Hotta, Y. (1999) A novel glycine-rich protein is associated with starch grain accumulation during anther development. *Plant Cell Physiol.* 40:406-416.
- Nam, Y.W., Penmetsa, R.V., Endre, G., Uribe, P., Kim, D., Cook, D.R. (1999) Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* and identification of clones containing ethylene-response genes. *Theor. Appl. Genet.* 98:638-646.

Orosz, L., Svab, Z., Kondorosi, A., Sik, T. (1973) Genetic studies on Rhizobiophage 16-3. I. Genes and functions on the chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 125:341-350.

Park, A.R., Somi, K.C., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., Sachetto-Martins, G., Park, O.K. (2001) Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *J. Biol. Chem.* 276:26688-26693.

Peterson, M.A., Barnes, D.K. (1981) Inheritance of ineffective nodulation and non-nodulation traits in alfalfa. *Crop Science* 21:611-616.

Potenza, C., Thomas, S.H., Sengupta-Gopalan, C. (2001) Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Sci.* 161:289-299.

Putnoky, P., Grosskopf, E., Ha, D.T., Kiss, G.B., Kondorosi, A. (1988) *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. *J. Cell Biol.* 106:597-607.

Reddy, A.S., Poovaiah, B.W. (1987) Accumulation of a glycine rich protein in auxin-deprived strawberry fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:885-891.

Rohde, W., Rosch, K., Kroger, K., Salamini, F. (1990) Nucleotide sequence of a *Hordeum vulgare* gene encoding a glycine-rich protein with homology to vertebrate cytokeratins. *Plant Mol. Biol.* 14:1057-1059.

Ross, J.H., Murphy, D.J. (1996) Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. *Plant Journal* 9:625-637.

Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., de Oliveira, D.E. (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim. Biophys. Acta* 1492:1-14.

Sandal, N.N., Bojsen, K., Richter, H., Sengupta-Gopalan, C., Marcker, K.A. (1992) The nodulin 24 protein family shows similarity to a family of glycine-rich plant proteins. *Plant Mol. Biol.* 18:607-610

Santino, C.G., Stanford, G.L., Conner, T.W. (1997) Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes. *Plant Mol. Biol.* 33:405-416.

Schröder, G., Frühling, M., Pühler, A., Perlick, A.M. (1997) The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* 33:113-123.

Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M., Kondorosi, A. (1994) Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Review of Cytology* 156:1-75.

Schultze, M., Kondorosi, A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32:33-57.

Shi, L., Twary, S.N., Yoshioka, H., Gregerson, R.G., Miller, S.S., Samac, D.A., Gantt, J.S., Unkefer, P.J., Vance, C.P. (1997) Nitrogen Assimilation in Alfalfa: Isolation and Characterization of an Asparagine Synthetase Gene Showing Enhanced Expression in Root Nodules and Dark-Adapted Leaves. *Plant Cell* 9:1339-1356.

Showalter, A. M., Zhou, J., Rumeau, D., Worst, S.G., Varner, J.E. (1991) Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. *Plant Mol. Biol.* 16:547-565.

Szczyglowski, K., Hamburger, D., Kapranov, P., de Bruijn, F.J. (1997) Construction of a *Lotus japonicus* late nodulin expressed sequence tag library and identification of novel nodule-specific genes. *Plant Physiol.* 114:1335-1346.

Timmers, A.C., Auriac, M.C., Truchet, G (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126:3617-3628.

Trinh, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamaté, K., Brown, S., Bauer, P., Kondorosi, A. (1998) Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* lines improved for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reprod.* 17:345-355.

Vance, C.P., Gantt, J.S. (1992) Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant* 85:266-274.

van der Heijden, M.G.Á., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72.

van Kammen (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2:43-45.

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* 172:4295-4306.

Vasse, J., de Billy, F., Truchet, G. (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* 4:555-566.

von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.

Wall, L.G. (2000) The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:167-182.

White, J., Chang, S.Y.P., Bibb, M.J. (1990) A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygrosopicus*: a selectable marker for the plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 18:1062.

Xu, D., Lei, M., Wu, R. (1995) Expression of the rice *Osgrp1* promoter-Gus reporter gene is specifically associated with cell elongation/expansion and differentiation. *Plant Mol. Biol.* 28:455-471.

11. Summary

11.1. Introduction

In plants, glycine-rich proteins exhibit high structural diversity. This large gene family is characterized by quasi-repetitive glycine-rich domains, most frequently with GGGX, GGXXXGG or GXGX repeats, resulting in proteins of distinct sizes (reviewed by Sachetto-Martins et al. 2000). The diverse expression pattern and subcellular localization of various *GRPs* suggest their implication in different physiological processes.

Most *GRPs* are developmentally regulated and induced by several biotic and abiotic factors. At subcellular level, many *GRPs* were localized in the cell wall or were membrane associated but they were found also in the nucleus and cytosol. Organ- and tissue-specific expression studies showed the presence of *GRP* transcripts in the protoxylem, xylem and phloem, as well as in epidermal tissues. Several highly expressed glycine-rich proteins, based on their cell wall localization, were reported as structural components of the plant cell wall, similarly to proline-rich or hydroxyproline-rich proteins (Cassab 1998). Various studies on the regulation of the *GRP* genes suggest their multiple roles in plant development. Functional studies revealed that *GRPs* might be implicated in cell lignification and mediating membrane-cytoskeleton or membrane-cell wall interconnections. So far, only the *Arabidopsis thaliana* AtGRP3 function has been demonstrated, which plays a role in the WAK1 (wall-associated receptor kinase) signaling pathway where its binding to the WAK1 receptor kinase is necessary for the activation of KAPP, a kinase-associated phosphatase.

GRPs were also isolated from nitrogen-fixing root nodules of *Vicia faba* (Küster et al. 1995; Schröder et al. 1997). These *GRP* genes (*Vfnod-GRP1*, *Vfenod-GRP2*, *Vfenod-GRP3*,

Vfnod-GRP4 and *Vfenod-GRP5*) exhibited nodule-specific expression and tissue print hybridization localized their transcripts mainly in the interzone II-III and the nitrogen-fixing zone III of their nodules. Nodulin 24, a constituent of the peribacteroid membrane in soybean (Cheon et al. 1994) was also classified as GRP. In the nitrogen-fixing symbiosis between *Frankia* and the actinorhizal plant, *Alnus glutinosa* nodule-specific glycine-rich proteins were also detected in the cortical cells of infected nodules (Pawlowski et al. 1997). In *Medicago*, *NMs22* (Ganter et al. 1998) appears to encode a nodule-specific alfalfa glycine-rich protein. Screenings and sequencing of *Medicago* cDNA libraries resulted also in the identification of homologues of the broad bean *Vfnod-GRP5* from *M. sativa* (Jiménez-Zurdo et al. 2000) and from *M. truncatula* (Györgyey et al. 2000).

11.2. Results

For the isolation of genes encoding glycine-rich proteins we used a cDNA-library made of young nodules of *Medicago sativa* ssp. *varia* A2 plant to hybridize with the *V. faba* cDNA clones. These screenings resulted in the isolation of 37 cDNAs that represented four distinct genes encoding glycine-rich proteins. *MsnodGRP1* represented by 11 cDNAs was isolated with the *Vfnod-GRP1* probe that displayed a limited homology (66 % identity) with the probe. Screening with *Vfnod-GRP4* led to the isolation of 16 clones corresponding to two types of cDNAs designated as *MsnodGRP2A* and *MsnodGRP2B*, respectively, that were highly homologous to each other but distinct of *Vfnod-GRP4*. The *MsnodGRP3* cDNAs (10 clones) were obtained with *Vfenod-GRP5* and exhibited 72 % identity with the probe.

The *MsnodGRP1*, *MsnodGRP2A*, *MsnodGRP2B* cDNA clones were partial. A homology search in the *M. truncatula* EST database has led to the identification of the full-

length sequences of these clones. All of these cDNAs coded for small putative proteins. The MsnodGRP1 protein contained 112, MsnodGRP2A 101, MsnodGRP2B 114, MsnodGRP3 217 amino acids (Fig. 1). All of them possessed a putative hydrophobic amino terminal secretory signal peptide and a glycine-rich carboxy terminal part. In the MsnodGRP1, MsnodGRP2A and MsnodGRP2B gene products no glycine-rich repetitive blocks were present, in contrast to MsnodGRP3, which contained four repeats of 42, 40, 42 and 42 amino acids including a conserved WRDWGGSFV oligopeptide sequence (Fig. 1). The molecular structure of MsnodGRP3 resembled to that of NMs22 from alfalfa and that of Vfenod-GRP5 (Fig. 2). MsnodGRP2A and MsnodGRP2B showed only a weak homology to Vfenod-GRP4, but exhibited 85% similarity and 80 % identity to each other (Fig. 3). The signal peptides of MtnodGRP2A and MtnodGRP2B proteins shared significant homology with the putative signal peptides of MtN29 (Gamas et al. 1996) and a few other glycine-rich proteins predicted from EST sequences (*TC40868*, *TC41363*, *TC35313*) present in the *M. truncatula* databases (Fig. 4). The respective genes encoded also small proteins that exhibited significantly high glycine content beside the putative hydrophobic signal peptide, but the homology values between the glycine-rich domains displayed only 60-65% similarity and 30-35% of identity. By screening the *M. truncatula* nodule cDNA library with the *MsnodGRP1*, we obtained three variants; *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B* and *MtnodGRP1C*. The encoded proteins were homologous to MsnodGRP1 both at the N-terminal signal peptide region and in the C-terminal part, but between them the central regions were less conserved (Fig. 4).

Expression of the isolated *GRP* genes was investigated by Northern analysis using RNA isolated from different organs of alfalfa. No expression of any of the four *GRP* genes was detected in flowers, leaves, stems, hypocotyls, roots or spontaneous nodules, but all were expressed in *S. meliloti*-induced nodules. Expression of the *MsnodGRP1* as well as the

MsnodGRP2A and *MsnodGRP2B* genes was predominant in young nodules, while the *MsnodGRP3* transcript accumulation increased during nodule development (Fig. 5). The possible requirement of bacteria for the expression of *MsnodGRP* genes was further studied with the help of two *S. meliloti* mutants. AK1492 is a double mutant of *S. meliloti* strain 41, unable to produce exopolysaccharide (EPS) and capsular polysaccharide (KPS) which is thereby impaired in the infection process (Exo⁻Kps⁻Inf⁻ mutant), while strain 8368 was defective in bacteroid differentiation (Bac⁻). In the AK1492 nodules the expression of all the four *GRPs* was drastically reduced, in contrast to the nodules induced by the Bac⁻ mutant where expression of the *GRP* genes was unaffected (Fig. 6). These results indicated that the expression of these *GRP* genes might be controlled either by bacterial polysaccharide signals and/or might require invasion of the nodule cell by rhizobia. Several *GRP* genes are regulated by hormones and osmotic stress; we also investigated whether the expression of these nodule-specific *GRP* genes was induced by other factors than rhizobia. Treatment of alfalfa roots with naphthalene acetic acid, abscisic acid, kinetin and gibberelic acid or exposing them to heat and cold shocks, hypoxia and drought stresses, however, did not result in the expression of the nodule-specific *GRPs* tested by RT-PCR. The expression profiles of the *MsnodGRP2A*- and *MsnodGRP2B*-related *M. truncatula* genes were also studied. No expression of any of these genes was detected in roots, while all of them were induced during nodule development, albeit with different kinetics (Fig. 7).

The induction of the *GRP* genes during nodule development was studied by RT-PCR experiments where cDNAs were constructed from roots of seedlings inoculated with *S. meliloti* at 0-3 days post inoculation (dpi), from nodule primordia (4-5 dpi), from young (7-10 dpi) and mature nodules (15-28 dpi). In the case of *MsnodGRP1*, a weak background signal was detectable in the root, while a significant increase in the mRNA abundance was observed

at 4 dpi, reaching its maximum at 5dpi that was maintained during the development and maturation of nodules (Fig. 8A). *MsnodGRP2A* and *MsnodGRP2B* were strongly induced at 5 dpi (1 day later than *MsnodGRP1*) with a maximal transcript accumulation at 7 dpi, which then decreased gradually (Fig. 8B). Induction of *MsnodGRP3* gene started at day 7 and was maximal through the active, nitrogen-fixing period (Fig. 8C). As a control for nodule development, expression of the early nodulin gene, *Msenod40* was included (Fig. 8D). The differences in the expression kinetics indicated that the *MsnodGRPs* might be involved in consecutive stages of nodule development with different functions.

To determine the spatial expression patterns of the *GRP* genes in the nodules, *in situ* hybridizations were carried out with their sense and antisense RNA probes. The *MsnodGRP1* transcripts were localized in the nodule apex in zone II with the highest expression level in the cells adjacent to interzone II-III, while no signals were detected in the nitrogen fixation zone III (Fig. 9A-B). The *MsnodGRP2* genes exhibited expression exclusively in the interzone II-III (Fig. 9D), and predominantly in a single cell layer (Fig. 9E). In the case of *MsnodGRP3*, no hybridization signals were detected in the nodule apex, and the expression appeared to be associated with the nitrogen-fixing symbiotic cells in zone III (Fig. 9G), however, in a few cases, the hybridization signals were stronger in the early symbiotic zone than in the older cells of zone III (Fig. 9H). The lack of background signals on nodule sections hybridized with the sense RNA probes (Fig. 9C, 9F, 9I) and the restricted signal localizations obtained with the antisense probes confirmed that these hybridizations were specific for all the three *nodGRPs*.

All *nodGRP* genes were mapped on the genetic map of *M. sativa*. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) method was used to localize the genes on the 8 linkage group (LG) of alfalfa. The *MsnodGRP1* gene was mapped on the LG5 (Fig. 10B), while

MsnodGRP2A, *MsnodGRP2B* and *MsnodGRP3* genes were found on the LG2 (Fig. 10A). There was no genetical distance between *MsnodGRP2A* and *MsnodGRP2B* genes, but both were settled in a big genetical and physical distance to *MsnodGRP3* gene. The *M. truncatula* genomic clones (BAC-clones) carrying *nodGRP* genes were also isolated to reveal their molecular structure. Genomic sequences of *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C*, *MtnodGRP2A*, *MtnodGRP2B* and *MtnodGRP3* genes were isolated. Most genes possessed 2 or 3 exons (Fig. 11A-B), except *MtnodGRP3*, which had 4 exons based on its repetitive structure (Fig. 11C). In all cases, the first exon contained mainly the sequence of the signalpeptide. The putative promoter regions of *MtnodGRP1* genes showed high homology to each other, as well as the promoters of *MtnodGRP2* genes.

For functional studies we tried to generate down-regulation of *nodGRPs* genes with *M. truncatula* transgenic plants expressing antisense *nodGRPs*. The *MsnodGRP1* and *MsnodGRP2A* cDNAs were cloned in antisense orientation into a plant binary vector, introduced into *Agrobacterium tumefaciens* and then transformed into the *M. truncatula* R108 line according to Trinh et al. (1998). 6 independent lines of *MsnodGRP1* and *MsnodGRP2A* were tested for antisense expression. Two highly expressing lines for *MsnodGRP1* and two for *MsnodGRP2A* (Fig 12A) were selected and analyzed further. Nodulation was unaffected in most T1 plants, except in three, which derived from the T0 line *MsnodGRP2/15* expressing the antisense *MsnodGRP2A* cDNA at the highest level (Fig 12A). In these lines, the nodules were round-shaped and halted at the stage of infection and nitrogen-fixing nodule differentiation; moreover their dark color indicated senescence and cell death (Fig 12B). T2 generation of these plants were tested again for nodulation, but unfortunately, we could not find the aborted-nodulating phenotype, in this way we could not prove that the antisense effect of *nodGRP* was in coherence with the phenotype of these aborted nodules.

11.3. Discussion

We present the isolation and characterization of different glycine-rich proteins from *M. sativa* and *M. truncatula* nodules. These proteins like most glycine-rich proteins displayed a secretory signal peptide followed by a glycine-rich domain, however, their glycine content was lower (20-30%) than in other GRPs (where it was around 80% or even higher). These genes expressed exclusively in *Medicago* nodules confirming that they represent a novel subfamily of the *GRP* genes.

Compared to the characteristic features of non-nodule-specific GRPs (Sachetto-Martins et al. 2000) in these proteins only few repetitions of a GGX sequence were present. The *MsnodGRP3* was the only one that contained four repeats of an oligopeptide sequence with the WRDWGGSEFW motif. The primary structures of *MsnodGRP2A* and *MsnodGRP2B* were highly homologous and were encoded by different genes as it was revealed by the isolation of the corresponding *M. truncatula* clones. The signal peptides of *MsnodGRP2A/B* exhibited significant homologies with three proteins predicted from *M. truncatula* EST sequences (TC40868, TC41363, TC35313), which also displayed glycine-rich domains. One of the signal peptide homologues was *MtN29* (Gamas et al. 1996). Similar signal peptide was present in the early nodulin *Enod7* from *Pisum sativum*, but the glycine content of this putative protein was relatively low. *MsnodGRP1* had three related genes in *M. truncatula* (*MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B*, *MtnodGRP1C*), but they were not real orthologues, the homology was extended to the signal peptide and the carboxy terminal part of the proteins, while the central regions were less conserved (Fig. 4). The molecular organization of the *nodGRP*-genes also showed similarities to each other. Their first exon contained mainly the signalpeptide, while the last one had the glycine-rich domain, except the *MtnodGRP3* gene, in

which the exons contained the repetitions as it was detected in the molecular structure of their cDNA. The *nodGRP*-genes were localized in different regions of the linkage groups of alfalfa, which suggested that they have far different origin or at least, their evolution split long time ago.

Relatedness of the GRP nodulins is presented in a phylogenetic tree (Fig. 13). As it was expected, *MsnodGRP1* and the *MsnodGRP1*-related *M. truncatula* proteins, *MtnodGRP1A*, *MtnodGRP1B* and *MtnodGRP1C* formed one group. Interestingly, the signal peptide homologues of *Ms/MtnodGRP2s*, TC40868, TC41363 and TC35313 were on distinct branches from the *Ms/MtnodGRP2* proteins. TC40868 and TC41363 proteins were in the group of the *Ms/MtnodGRP3* proteins. This group included *NMs22/NMt22*, *Vfenod-GRP5*, *DD17* and *Vfenod-GRP3* as well. TC35313 was more related to the *nodGRP1* proteins. The *MsnodGRP2s* and *MtnodGRP2s* were related to *Vfnod-GRP4*. *MtN29*, the signal peptide homologue of *Ms/MtnodGRP2s* exhibited distinct origin. Taking into account that most of these *nodGRPs* showed no homology to other glycine-rich proteins, these nodulation-related GRP proteins represent both a novel class of GRPs and a novel group of nodulins.

Expression of all *Medicago* *nodGRPs* was nodule-specific and required infection by rhizobia, however, their activation and maximal transcript accumulation were different during nodulation. The *MsnodGRP1* gene was turned on 4 dpi, when nodule primordium differentiates to a meristem and an invasion zone where infection of plant cells with bacteria occurs. Consistently with the expression kinetics, the *MsnodGRP1* transcripts were localized by *in situ* hybridization along all cell layers of zone II where they were particularly abundant in the distal cell layers and in the interzone II-III but were absent in zone III. This expression profile suggests that *nodGRP1* might be involved in the differentiation of the symbiotic tissue. Transcripts of *MsnodGRP2A* and *MsnodGRP2B* were indistinguishable by Northern analysis

due to the cross-hybridization of the genes. Using specific oligos for each gene, RT-PCR experiments demonstrated that none of the two genes expressed in roots and both were activated at 5 dpi. At days 5 to 7 the distal cell layers of zone II are converted into nitrogen-fixing symbiotic cells. During this period, transcript accumulation of *MsnodGRP2s* increased 5-fold and then decreased gradually. *In situ* hybridization revealed the exclusive presence of the *MsnodGRP2* transcripts in the interzone II-III, in two or maximum three cell layers, where the most drastic and probably the most critical developmental changes occur prior to terminal differentiation of nitrogen-fixing symbiotic cells. As revealed by RT-PCR analysis of root and nodule RNAs, expression of the signal peptide homologues of Ms/MtnodGRP2s (TC40868, TC41363 and MtN29) was nodule-specific as well. Northern analysis demonstrated that expression of *MsnodGRP3* was induced at 7 dpi in the young nitrogen-fixing nodules and was predominant during the period of active nitrogen fixation. By *in situ* hybridization, the *MsnodGRP3* transcripts were detected in the nitrogen-fixing cells in zone III that correlated with the relatively retarded induction of *MsnodGRP3* compared to *MsnodGRP1* and *MsnodGRP2A/B* and with the elevated transcript levels through the active nitrogen-fixing period.

The expression pattern of the *nodGRP* genes in nodules induced by *S. meliloti* mutant strains demonstrated that activation of all studied *nodGRP* genes required bacterial infection, but was indifferent of bacteroid differentiation. Differential activation kinetics of these genes and distinct spatial localization of the *nodGRP* mRNAs indicate that they might have distinct functions during nodule organogenesis. Their expression in particular zones and cell layers suggests that these nodGRPs may be involved in signaling processes, similarly to the AtGRP3, which is a binding partner of the cell wall-integrated WAK1 protein that is responsible for development of leaf cells (Kohorn 2001). During nodule differentiation, when

bacteria invade the host cells, nodGRP1 and nodGRP2A/B might function or be involved as signals for the production of specific molecular structures (such as peribacteroid membranes) that are required for the development of symbiotic cells. The function of nodGRP2A/B appears to be, however, more specific and might be required for terminal differentiation of symbiotic cells. In contrast to nodGRP1 and nodGRP2A/B, nodGRP3 plays a role in a later stage of symbiosis associated with nitrogen fixation. The possible involvement of these nodGRPs in *Rhizobium*-elicited signaling processes is in line with their exclusive nodule-specific expression and with the finding that none of the *MsnodGRPs* was induced by biotic and abiotic regulators of the other, non-nodule-specific GRPs.

Elucidation of the real nodGRP functions would necessitate the analysis of knock out *M. truncatula* mutants. Although, construction of tagged *M. truncatula* mutant banks is in progress in the laboratory, their creation will take several years. Therefore, as alternative approaches for gene silencing, we have started the generation of antisense and RNAi transgenic *M. truncatula* plants to evaluate the importance of nodGRPs in nodule development. For transgenic studies in nodulation, isolation of the promoter regions of *nodGRP* genes could also be extremely useful to drive localized and nodule-specific gene expression. The identification of interacting protein partners of the nodGRPs is expected to give an insight into the putative signaling pathways. Therefore, yeast two hybrid screens will be performed for isolation of the nodGRP partners. All these future studies will contribute to the elucidation of the biological functions of the nodGRPs that appear to be specific for leguminous plants forming indeterminate nodules.

12. Tudományos közlemények

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.

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