

**Doktori értekezés tézisei**

**József Attila Tudományegyetem Természettudományi Kar**

Az ENOD12 korai nodulációs gén molekuláris genetikai jellemzése  
**Medicago** növényekben

**Írta: Csanádi Gyula**

**MTA SZBK, Genetikai Intézet  
Nitrogénkötési Csoport**

**1997.**



## I. Tudományos előzmények és célkitűzések

A nitrogén az élővilág számára nélkülözhetetlen elem. Alkotórésze az élő szervezetben található fehérjéknek, a fehérjéket kódoló nukleinsavaknak, valamint olyan fontos, biológiailag aktív molekulák felépítésében vesz részt, mint például a vitaminok és az intermediér anyagcsere számos molekulája. Az élőlények számára létfontosságú, hogy szervezetük nitrogénellátását a környezetükben található forrásokból folyamatosan biztosítsák. A legjelentősebb nitrogénforrás a levegő, melynek körülbelül 78%-a nitrogén. E hatalmas készlet azonban a kémiaiailag rendkívül stabil, hármass kötésű dinitrogén molekula formájában van jelen, melyet az élőlények közül csak néhány mikroorganizmus képes közvetlenül hasznosítani. E mikrobák közül a leghatékonyabban a pillangósvirágú gazdanövényvel szimbiózisban élők redukálják a nitrogént. Az együttműködés kialakításában és működésében szerepet játszó genetikai elemek vizsgálatával a világ számos laboratóriumában foglalkoznak. E munka során mostanáig sikerült azonosítani a mikrobiális partner számos szimbiotikus génjét, és elkezdődtek a növényi partner géneinek megismerésére irányuló kutatások.

A szimbiotikus kapcsolat kialakulása összetett, több lépésből álló folyamat, melynek során a gazdanövény gyökerén kialakul egy speciális képződmény, a gyökérgümő. A szimbiózis folyamatát fejlődésbiológiai szempontból négy fő szakaszra oszthatjuk. Az első szakasz az úgynevezett *preinfekció* időszaka, a második az *infekciós és gümőkialakulási* periódus, míg a harmadik szakasz a gümő működésének beindulását és fenntartását foglalja magában. Negyedik az öregedési időszak, melyet a szövetek előregedéséből származó szövetpusztulás jellemez. A nitrogénkötő gümő kialakulásának folyamata bakteriális és növényi gének együttműködésén, és a két egyed közötti folyamatos jelcserén alapszik. Az ebben szerepet játszó növényi gének az úgynevezett *nodulin gének*, melyek a gümőszövetben fejeződnek ki. Megjelenésük időbeli - és gyakran térbeli - elkülönülése alapján *korai* (ENOD) - ezek a preinfekció illetve az infekció során fejeződnek ki - és *késői* (NOD) génekre oszthatjuk őket.

A gümőfejlődés során megnyilvánuló korai nodulin gének közül mostanáig legalaposabban az ENOD12-t tanulmányozták. Ez a gén a korai szimbiotikus folyamatokban feltételezett központi szerepe miatt számos kutató érdeklődésének középpontjába került, "slágergénnek" számított a korai nodulációs gének között. A fokozott érdeklődés egyik oka, hogy az ENOD12 gén a szimbiózis kialakulása során nemcsak a már baktériumot tartalmazó növényi

sejtekben, hanem a baktériumok fogadásához szükséges infekciós fonal elkészítésére felkészülőkben is kifejeződik. Emellett a gümökezedmény osztódó sejtjeiben is kimutatható, így feltételezhető volt, hogy a génnek sokoldalú szerepe van a gümökialakulás folyamatában.

Az intront nem tartalmazó ENOD12 gén egy olyan feltételezett fehérjé kódol, mely az N-terminális végén tartalmaz egy szignál peptid jellegű hidrofób régiót, míg a többi része két, ismétlődő pentapeptid egységből épül fel. Ezen sajátságok alapján azt feltételezték, hogy az ENOD12 fehérje a hydroxiprolin-gazdag glikoproteinek (HRGP) családjába tartozik, és az infekciós folyamat során az új sejttal előállításában vehet részt. Bár a feltételezett ENOD12 protein jelenlétét mostanáig nem sikerült bizonyítani, valószínűnek látszik, hogy az nem vesz részt a növényi védekezésmechanizmusban.

Korábbi kísérletekben számos laboratóriumban egyértelműen bizonyították, hogy az ENOD12 gén kifejeződik a gümöfejlődés során. Arra azonban nem szolgáltatott bizonyítékot, hogy az ENOD12 génnek van-e funkciója, és ha van, ez a funkció elengedhetetlenül szükséges-e a gümöfejlődéshez vagy a hatékony nitrogénkötéshez. E kérdés megválaszolásához legmegfelelőbb a genetikai megközelítési mód, vagyis az ENOD12 génben mutáns növények előállítása, illetve természetesen előforduló mutáns növények azonosítása és funkcionális vizsgálata. Ha a mutációt szenvedett gént tartalmazó egyedekben ki tudunk mutatni a gümöfejlődésben történt valamely változást, megállapíthatjuk, hogy az ENOD12 gén funkcionális, és a változás jellegétől függően következtethetünk a funkcióra. Ellenkező esetben azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a génnek az adott növényben nincs nélkülözhetetlen szerepe a gümöfejlődési folyamatban.

A genetikai megközelítés jelentőségét felismerve csoportunk munkatársai Dr. Kiss György Botond vezetésével évekkel ezelőtt megkezdték a *Medicago sativa* komplexhez tartozó lucerna növények genetikai térképének megszerkesztését. Ezt a munkát a diploid, kékvirágú *Medicago sativa* ssp. *coerulea* (Mc) és a szintén diploid, sárga virágszínű *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* (Mq) alfajokon végeztük el, melyek idegenbeporzó, élő növények, egymással és a természetett lucernával is keresztezhetőek. A megszerkesztett lucerna genetikai térkép nyolc kapcsoltsági csoportot tartalmazott, mely megegyezik a lucerna haploid kromoszómaszámaival. Munkánk során számos nodulin gént sikerült térképeznünk, valamint lehetővé vált egyes molekuláris szinten kimutatható, természetesen előforduló mutációk azonosítása, öröklődésük vizsgálata.

Csoportunk munkájának alapvető célja a lucerna szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő génjeinek molekuláris szinten történő megismerése genetikai és biokémiai módszerek alkalmazásával. A dolgozatom tárgyát képező vizsgálatok elkezdésekor célunk volt az ENOD12 korai nodulációs gén szimbiózisban betöltött szerepének vizsgálata diploid lucerna növényekben. Ennek során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- az általunk vizsgált lucernafajokban hány ENOD12 gén található,
- az elkészült lucerna genetikai térképen hány ENOD12 gént tudunk kimutatni, illetve mely kapcsoltsági csoportban helyezkedik el az ENOD12 gén(ek), illetve ha több gén van, a gének között van-e genetikai kapcsoltság,
- tudunk-e azonosítani diploid lucernapopulációnkban olyan egyedeket, melyek ENOD12 génjükben mutációt szenvedtek: amennyiben igen,
- a mutációt hordozó növények keresztezésével olyan egyedeket terveztünk előállítani, melyek homozigóta formában hordozzák a mutáns gént, ezáltal alkalmasak a gén esetleges funkciójának vizsgálatára,
- a mutáns homozigóta egyedek funkcionális vizsgálatával azt terveztük megvizsgálni, vajon van-e létfontosságú szerepe az ENOD12 génnek a szimbiózisban, és ha van, akkor milyen jellegű funkciót lát el,
- az ENOD12 szekvenciaadatok felhasználásával milyen evolúciós rokonsági viszonyokat tudunk megállapítani az egyes pillangósvirágúak között

## II. Alkalmazott kísérleti módszerek

A kísérleteinkhez a sárgavirágú, diploid ( $2n=2x=16$ ) *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* Sinsk. (Mq) és a kék virágú, diploid ( $2n=2x=16$ ) *Medicago sativa* ssp. *coerulea* Ledeb. (Mc) lucerna növényeket használtuk, melyek magjait Prof. Bócsa Iván (Gödöllői Mezőgazdasági Egyetem Kutatóintézete, Kompolt) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az ENOD12 gén jelenlétének kimutatásához DNS-DNS (Southern) hibridizációs, és polimeráz láncreakciós (PCR) kísérleteket végeztünk az Mqk93 jelű *M. sativa* ssp. *quasifalcata* és az Mcw2 jelzésű *M. sativa* ssp. *coerulea* növényekből izolált totál genomikus DNS-en. A PCR-reakció során kapott ENOD12 DNS-szakaszokat izoláltuk, majd didezoxi-láncterminációs módszer segítségével nukleotidsorrendjüket meghatároztuk.

Az szekvenenciaanalízis eredményeinek felhasználásával a korábban már közölt különböző pillangósvirágúak és az Mq, Mc növényekből származó ENOD12 gének közötti rokonságot megállapítottuk. Az egyes szekvenciákat a *M. sativa* ENOD12B (SB) bázissorrendjének templátként való felhasználásával számítógép segítségével illesztettük. Az illesztett szekvenciák közötti nukleotid-különbségeket az összes párosítási lehetőség esetében kiszámoltuk. Az abszolút különbségek számát és százalékos értékeit táblázatban tüntettük fel. A deléciókat egy eltérésnek vettük. Az ebből számolt százaléktételek szintén megtalálhatók a táblázatban, melyek alapján evolúciós fát készítettünk az összekvencia módszer és a távolságmátrixon alapuló módszer felhasználásával. Az elágazási pontokat a közös ősszekvencia módszerrel határoztuk meg. Az adatokból evolúciós fát készítettünk, melyen az egyes fajok ENOD12 génei, illetve ezt kiterjesztve az egyes növények közötti rokonságot ábrázoltuk.

A gének öröklődésének vizsgálatához a két lucerna alfaj egy-egy egyedének keresztezéséből származó egyedi F1 növény F2 utódait használtuk. Az Mq növényt használtuk anyaként, az Mc-t pedig apaként abban a keresztezésben, melynek során előállítottuk az F1 hibridnemzedéket (F1/1, F1/2, F1/4, F1/5, F1/11, F1/12 és F1/13). Ezek átmeneti (zöld) virágszínűek lettek, mely a hibridjelleg egyszerű bizonyítéka. Az F1/1 jelű egyedi F1 növény önbeporzásával állítottuk elő a második utódnemzedéket F2(S1[F1/1]). Az Mcw2 növény

önbeporzásával állítottuk elő az S1(S1[Mcw2]) utódokat. A növényeket 30 cm átmérőjű cserepekben neveltük üvegházi körülmények között 22-27 C<sup>o</sup>-on 16 órás fényperiódussal. Az ENOD12 gén öröklésmentének vizsgálatához a szülőkből, az F1/1, F1/11, F1/12 és F1/13 növényekből, valamint az F2 populáció egyedeiből izolált totál genomikus DNS-eket hibridizáltuk ENOD12 radioaktívan jelölt DNS-próbával. Hasonlóképpen elvégeztük az Mq, Mc F1/1, F1/11, F1/12 és F1/13 egyedek polimeráz láncreakciós vizsgálatát, ENOD12 specifikus primerek felhasználásával.

A két szülőből (Mq illetve Mc) származó ENOD12 gének egymáshoz viszonyított helyzetének megállapítását hárompontos térképezéssel végeztük el. E kísérlet során az egyes ENOD12 gének, az OPD13 RAPD (random amplifikált polimorf DNS) marker és a LAP1 izoenzim marker genetikai kapcsoltságát állapítottuk meg az F2 és az S1 populációkban. Az adatokból a rekombinációs gyakoriságot és a kapcsoltság mértékét a maximális valószínűség (maximum likelihood) egyenlet alkalmazásával számítottuk ki, a MAPMAKER program felhasználásával, illetve Griffiths és munkatársai, valamint Rédei leírása alapján. Egy adott rekombinációs gyakoriság esetén várható genotípus-arányokat kontingencia-táblázatokban foglaltuk össze.

### III. Az eredmények összefoglalása

#### Az ENOD12 gén jellemzése *M. s. quasifalcata* k93 és *M. s. coerulea* w2 növényekben

Elsőként az ENOD12 szekvenciák Southern hibridizációs mintázatát vizsgáltuk az egymással keresztezhető *M. s. coerulea* w2 (Mcw2) és *M. s. quasifalcata* k93 (Mqk93) lucerna növényekben. Eredményként azt kaptuk (4 A. ábra, Mqk93 és Mcw2 oszlopok), hogy az Mqk93 növény egy 14 kilobázis (kb) nagyságú, míg az Mcw2 növény három darab - egy 25, egy 17 és egy 12 kb nagyságú - EcoRI fragmentet tartalmazott. A két növényben tehát különböző ENOD12 gének találhatók, vagyis a két egyed között genetikai polimorfizmus van az ENOD12 génben.

allélok!

A fentebb leírt különbségeket polimeráz láncreakció (PCR) technika felhasználásával is ki tudtuk mutatni. Az Mqk93 növényből egy 269 bázispáros (bp) fragment amplifikálódott (QA), míg az Mcw2-ből egy 299 bp-os (CB) és egy 239 bp-os (CA) fragmentet tudunk kimutatni (4 B. ábra Mqk93 és Mcw2 oszlopok). A PCR-amplifikációs és Southern-hibridizációs eredmények alapján, azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az Mcw2 növény két különböző (ENOD12<sup>w25</sup> és ENOD12<sup>w7</sup>), az Mqk93 pedig egyféle ENOD12 gént (ENOD12<sup>q14</sup>) tartalmaz.

Azt is sikerült megállapítani, hogy az Mcw2 egyedből kimutatható két amplifikációs termék (CA és CB) mérete megegyezik a *M. sativa* növény megfelelő fragmentjeivel (SA és SB), míg az Mqk93 egyed (QA) amplifikátumának mérete azonos a *M. truncatula* növény megfelelő (TA) fragmentjének méretével.

### **Az ENOD12 gének evolúciója**

Az Mqk93 és az Mcw2 növényekből származó amplifikációs termékek szekvenálása lehetővé tette számunkra, hogy a korábban már közölt szekvenálási adatok felhasználásával a különböző pillangósvirágúak ENOD12 génjei közötti rokonságot megállapítsuk.

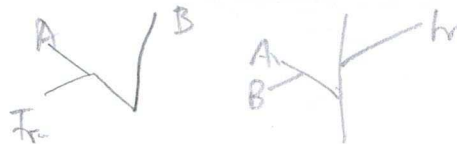
A korábban már említett egy Mqk93 és két Mcw2 amplifikációs terméket szekvenáltuk.....

Az egyes szekvenciákat a *M. sativa* ENOD12B (SB) bázissorrendjének templátként való felhasználásával illesztettük. Ebből az elrendezésből látszik, hogy az Mcw2-ből származó CA és CB gének nagymértékben homológok a *M. sativa* ENOD12B (SB) és ENOD12A (SA) génszakaszokkal. Azt is megállapítottuk, hogy az Mqk93 növény QA fragmentje hasonló a TA szekvenciához, amely a *M. truncatula* cv. Jemalong ENOD12 génjét jelöli. A CA, SA gének egy jellegzetes 30 bp-os, a QA és TA gének egy szintén jellegzetes 60 bp-os deléciót tartalmaztak. Ezek az eredmények alátámasztják feltételezésünket, hogy az Mcw2 növény két különböző, az Mqk93 pedig egy ENOD12 gént tartalmaz.

Az illesztett szekvenciák közötti nukleotid-különbségeket az összes párosítási lehetőség esetében kiszámoltuk és táblázatban feltüntettük.

Az adatokból készült evolúciós fát láthatjuk a 6. ábrán, melyen az egyes fajok ENOD12 génjei, illetve ezt kiterjesztve az egyes növények közötti rokonságot ábrázoltuk.

A *Medicago* ENOD12 elágazási pontja A és B génre megelőzte a *M. truncatula* leválását a *M. sativa* komplexről, bár e két esemény igen közel van egymáshoz



### Az ENOD12 gének öröklődése az Mqk93 és az Mcw2 növények utódaiban: A null allél kimutatása

Mivel az Mcw2 és az Mqk93 növények ENOD12 génjei között genetikai polimorfizmust találtunk, a gén térképhelyzetét megállapíthattuk. Ehhez először a két növény keresztezéséből származó F1 utódokban az ENOD12 genotípusát határoztuk meg. Az F1 növények EcoRI restriktions enzimmel emésztett DNS-ének ENOD12 specifikus próbával végzett hibridizálása során azt az eredményt kaptuk, hogy egyes F1 növények csak az Mqk93 növényben található ENOD12 gént (ENOD12<sup>q14</sup>) örökölték, míg másokban mindkét szülő génje megtalálható (ENOD12<sup>q14</sup>, valamint ENOD12<sup>w25</sup> és ENOD12<sup>w17</sup>). Például az F1/1 és F1/12 növények csak az ENOD12<sup>q14</sup> gént tartalmazzák, míg az F1/11 és az F1/13 egyedek mindhárom (ENOD12<sup>q14</sup>, ENOD12<sup>w25</sup> és ENOD12<sup>w17</sup>).

E növényekben az ENOD12 gének mintázatát PCR amplifikációs kísérlettel is vizsgáltuk, melynek eredménye a 4 B. ábrán látható. A DNS hibridizációs adatokkal megegyezően az F1/1 és az F1/12 egyedekben csak az Mqk93-ra jellemző 269 bp-os fragmentet tudtuk kimutatni, az F1/11 és az F1/13 utódokban pedig a két szülőre jellemző mindhárom DNS-szakasz amplifikálódott (239 bp, 269 bp, 299 bp). Mivel találtunk olyan F1 növényeket a két szülő utódai között, melyek csak az egyik szülőből származó géneket hordozták (ENOD12<sup>q14</sup>), és nem tudtuk kimutatni belőlük a másik szülőre (Mcw2) jellemző gének egyikét sem, azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az Mcw2 szülő az ENOD12<sup>w25</sup> és ENOD12<sup>w17</sup> gének mellett heterozigóta formában, valószínűleg egy deléciós esemény következtében egy null allélt tartalmaz (ENOD12<sup>w0</sup>).

Ha e feltételezésünk igaz, az ENOD12<sup>q14</sup>/ENOD12<sup>w0</sup> allélokot hordozó F1 növények önbeporzásából származó utódokban az apai homozigóta egyedek homozigóta null allélosok (ENOD12<sup>w0</sup>/ENOD12<sup>w0</sup>) lesznek, vagyis nem tartalmaznak ENOD12-vel hibridizáló



fragmentet. Hipotézisünk ellenőrzése céljából kiválasztottuk az F1/1 növényt, majd önbeporoztuk, és az ebből származó F2 utódnemzedékben (S1[F1/1]) vizsgáltuk az ENOD12 gének öröklésmenetét

Tizenhárom olyan egyedet találtunk, melyek nem tartalmaztak az ENOD12 próbához hibridizáló fragmentet.

Hipotézisünket alátámasztja az az eredmény is, hogy a Mcw2 növény önbeporzásából származó utódnövények között olyan növények is találhatóak, melyek nem tartalmaznak ENOD12 gént, vagyis homozigóták az ENOD12<sup>w0</sup> alléllra ✓

### **Az ENOD12<sup>q14</sup> gén térképhehelyzetének meghatározása**

Bár feltételezhető volt, azonban kísérletesen még nem bizonyítottuk, hogy a különböző ENOD12 gének ugyanabban a kromoszómaregiónban helyezkednek el. A térképezési kísérletekkel választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az általunk vizsgált növények genomjában található-e több, ENOD12 gént tartalmazó kromoszómális régió.

Az Mcw2 és Mqk93 növények ENOD12 génjében kimutatott, az F1/1 növénybe öröklődő genetikai polimorfizmus (ENOD12<sup>q14</sup>/ENOD12<sup>w0</sup>) lehetővé tette számunkra a gén térképezését. A térképhehely meghatározásához az F1/1 növény önbeporzásából származó F2 [S1(F1/1)] térképező populáció egyedeinek ENOD12 genotípusát állapítottuk meg. Megállapítottuk, hogy e gén a lucerna genetikai térkép 3. kapcsoltsági csoportjának egyik végén elhelyezkedő LAP1 izoenzim génjétől 23 centimorgan genetikai távolságra helyezkedik el. Ez a térképtávolság jó egyezést mutat a továbbfejlesztett genetikai térképen megfigyelhető 27 centimorgan (24 % rekombináció) távolsággal.

*Cloning over  
OK*

### **Az ENOD12<sup>w25</sup> és az ENOD12<sup>w17</sup> gének térképezése**

Mivel a genetikai térkép elkészítéséhez térképező populációként szolgáló F1/1 növénybe és annak utódaiba nem öröklődtek az Mcw2 szülőből származó gének (ENOD12<sup>w25/w17</sup>), e két gén térképhelyzetének megállapítására más megközelítést alkalmaztunk.

Az ENOD12<sup>w25</sup> és az ENOD12<sup>w17</sup> gének térképhelyzetének megállapítása céljából szegregációjukat megvizsgáltuk az Mcw2 növény önbeporzott utódaiban (S1[Mcw2]), és a kapott genotípusadatokat felhasználtuk a LAP1 génnel való kapcsoltság mértékének megállapítására. Amennyiben ez az érték közelítően egyezik az ENOD12<sup>q14</sup>/LAP1 gének kapcsoltságának értékével, megállapíthatjuk, hogy az ENOD12<sup>q14</sup> és ENOD12<sup>w25/w17</sup> ugyanazon a kromoszómán helyezkednek el, viszont azt nem tudjuk meghatározni, hogy a LAP1 génhez képest melyik irányban található.

A 149 S1 utódból 137 egyed ENOD12 és LAP1 genotípusát határoztuk meg.

A térképező és az S1(Mcw2) populációban a LAP1 és ENOD12 gének között kapott rekombinációs százalékok és térképtávolságok összehasonlítása alapján megállapíthatjuk, hogy az ENOD12<sup>w25/w17</sup> gének genetikailag kapcsolatosak a LAP1 génnel, és attól való genetikai távolságuk hasonló az ENOD12<sup>q14</sup>/LAP1 gének térképtávolságához. *CM?*

Az is kiderült továbbá, hogy az általunk vizsgált populációkban egyetlen olyan egyedet sem találtunk, melyben az ENOD12<sup>w25</sup> és az ENOD12<sup>w17</sup> között rekombináció történt (vagyis mindkét hibridizáló fragment mindig együtt öröklődött), ami azt jelenti, hogy e két gén szoros kapcsoltságot mutat. ✓

### **Az OPD13/1 RAPD marker felhasználása a hárompontos térképezéshez**

A fenti eredmények alapján nem lehetett eldönteni, hogy az ENOD12<sup>w25/w17</sup> gének a LAP1 génhez képest a kromoszóma vége felé (mint az ENOD12<sup>q14</sup>) vagy azzal ellentétes irányban helyezkednek-e el, azaz valóban ugyanabban a kromoszómális régióban található-e, mint az ENOD12<sup>q14</sup>. A kérdést a három pontos térképezés alkalmazásával terveztük megválaszolni. Ennek során három genetikai marker egymáshoz viszonyított térképtávolságait határozzuk meg, amiből az egyes markerek sorrendje egyértelműen megállapítható.

A hárompontos térképezés megvalósításához első lépésként azonosítanunk kellett egy olyan markert, amely genetikailag kapcsolatos mind az ENOD12<sup>w25/w17</sup>, mind pedig a LAP1

génekkel. E markert használhatjuk harmadik pontként a térképezés során, melynek segítségével meghatározhatjuk az ENOD12<sup>w25/w17</sup> gén helyzetét a LAP1-hez képest.

A genetikai marker azonosításához a Random Amplifikált Polimorf DNS (RAPD) nevű technikát használtuk. A marker kereséséhez az Mcw2 növény önbeporzásából származó populáció 28 egyedét használtuk, melyek között homozigóta ENOD12<sup>w0</sup>, homozigóta ENOD12<sup>w25/w17</sup> és heterozigóta növények is voltak. Amikor az OPD13 nevű tíztagú oligonukleotidot használtuk primerként és az Mcw2, Mqk93, valamint ezek utódaiból (F1/1, S1[F1/1]) származó DNS-t templátként, találtunk egy olyan kb. 800 bp nagyságú amplifikálódó fragmentet (OPD13/1), amely az összes ENOD12<sup>w0</sup> homozigóta, illetve heterozigóta egyedben megjelent, viszont azokban, amelyek nem tartalmazták az ENOD12<sup>w0</sup> (ENOD12<sup>w25/w17</sup>, ENOD12<sup>q14</sup> homozigóták) allélt, nem kaptunk amplifikációt. Az eredmény azt mutatta, hogy az általunk azonosított fragment genetikailag kapcsolt az ENOD12<sup>w25/w17</sup> génekkel, vagyis a hárompontos térképezéshez felhasználható.

Következő lépésként meghatároztuk az OPD13/1 marker genetikai távolságát a LAP1 géntől az S1(Mcw2) populációban, valamint vizsgáltuk mindkét populációban az OPD13/1 és az ENOD12 markerek közötti rekombináció mértékét is. Az első esetben a rekombinációs gyakoriság értéke 28% volt mindkét populációban, a második esetben pedig 5% illetve 4% rekombinációs gyakoriságot kaptunk a két populációban, ami jó egyezést mutat. A kapott eredményeink alapján megállapíthattuk, hogy a három marker sorrendje megegyezik a két populációban, vagyis az ENOD12<sup>q14</sup> és az ENOD12<sup>w25/w17</sup> gének ugyanabban a kromoszómális régióban helyezkednek el.

### **Az ENOD12 gén expressziója *M. s. quasifalcata* és *M. s. coerulea* növényekben. A csak ENOD12<sup>w0</sup> allélt tartalmazó növények gümöképzése és nitrogénfixáló képessége**

Annak eldöntésére, hogy az általunk azonosított ENOD12 gén funkcionális-e, az Mqk93 és Mcw2 szülők gümöiből izolált RNS-en reverz transzkripció PCR (RT-PCR) analízist végeztünk. Eredményként megkaptuk az Mqk93 és Mcw2 növényekre jellemző ENOD12 fragmenteket. Annak megállapítására, hogy a keletkezett fragmentek valóban ENOD12 gének, e fragmenteket radioaktív izotóppal jelölt ENOD12-specifikus próbával hibridizáltuk. Az ENOD12 próba a fragmentekkel erős hibridizációt adott, így

megállapíthattuk, hogy az RT-PCR módszer felhasználásával kimutatott DNS-szakaszok valóban ENOD12 gének. E kísérletekkel tehát igazoltuk, hogy az általunk vizsgált ENOD12 gének valóban kifejeződnek.

Az ENOD12 gént nem tartalmazó növények gümőképzési hatékonysága nem különbözött a vad típusú egyedekétől. Sem a kialakult gümők számában, sem a gümők mikroszkópos struktúrájában, sem pedig a növények nitrogénkötési hatékonyságában nem tudtunk különbséget kimutatni. Ezek alapján levontuk a következtetést, hogy a mi kísérleti körülményeink között, az általunk vizsgált lucernafajokban az ENOD12 gén jelenléte nem szükséges a hatékony gümőképzéshez és nitrogénkötéshez.

Összefoglalás: munkánk során először nyílt mód egy nodulációs gén funkciójának vizsgálatára. Természetese előforduló null allélt homozigóta formában hordozó egyedek azonosításával kimutattuk, hogy az ENOD12 gén a mi kísérleti körülményeink között nem játszik nélkülözhetetlen szerepet a szimbiotikus nitrogénkötés folyamatában. Az elvégzett kísérletek igazolják a genetikai térképezésen alapuló módszer hatékonyságát különböző gének funkciójának vizsgálatában.

## **8. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK**

### **8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

Kiss G.B., Csanádi Gy., Kálmán K., Kaló P., Ökrész L. (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Molecular and General Genetics* 238:129-137

Csanádi Gy., Szécsi J., Kaló P., Kiss P., Endre G., Kondorosi Á., Kondorosi É., Kiss G.B. (1994). ENOD12, an early nodulin gene is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *The Plant Cell* 6: 201-213

### **8.2. Egyéb közlemények**

Fehér, A., Preiszner J., Litkey Z., **Csanádi Gy.**, Dudits D.. (1992). Effectiveness of X-ray irradiation in induction of chromosome instability in interspecific somatic hybridisation between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. Theoretical and Applied Genetics 84:880-890

Savouré A., Kaló P., Petrovics Gy., **Csanádi Gy.**, Kiss G.B., Kondorosi Á., Kondorosi É. (1994). Identification, characterization and mapping of a full length cyclin gene in *Medicago sativa*. Plant. Mol. Biol. 27:1059-1070

### 8.3. Nemzetközi konferencia kiadványok

Kiss G.B., **Csanádi Gy.**, Kálmán K., Kaló P., Ökrész L. (1992). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. 9th International Congress on Nitrogen Fixation. Cancún; pp.:355

Kiss G.B., Kálmán K., **Csanádi G.**, Ökrész L., Györgyey J., Ráczkevy A.E., Brummer C., Kochert G. (1992). Construction of a basic genetic map of *Medicago*. EUCARPIA Congress. Lodi; pp. 56

Kiss G.B., **Csanádi Gy.**, Kálmán K., Ökrész L., Györgyey J., Ráczkevy A.E. (1992). Construction of a genetic map for *Medicago* IS-MPMI, Sixth International Symposium On Molecular Plant-Microbe Interactions. Seattle, Washington. pp. 348

Kaló P., Endre G., **Csanádi Gy.**, Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*). 4th International Congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam pp. 24



Kaló P., **Csanádi Gy.**, Endre G., Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of *Medicago sativa*. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Edinburgh pp. 108

Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of *Medicago sativa*. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on Safe application of Genetically modified Microorganisms in the Environment. Kiss G.B., Endre G. (eds.) Szeged, Officina Press p:330

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). An improved linkage map for alfalfa. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on Safe application of Genetically modified Microorganisms in the Environment. Kiss G.B., Endre G. (eds.) Szeged, Officina Press p:169

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). An improved genetic map for *Medicago*. In: 34th North American Alfalfa Improvement Conference. Guelph, Canada p:6

#### **8.4. Hazai konferencia kiadványok**

**Csanádi G.**, Kaló P., Kiss P., Endre G., Szécsi J., Kondorosi É., Kondorosi Á, Kiss G.B. (1994). Az ENOD12 korai nodulációs gén szerepének vizsgálata diploid *Medicago* növényekben. In: A Magyar Genetikusok Egyesülete III. konferenciája előadásainak és posztereinek összefoglalói. Debrecen p:125

Kiss G.B., **Csanádi G.**, Endre G., Kaló P. (1994). Első Növénynevelési Tudományos Napok. In: Heszky L. (ed.) Budapest p:125

Kiss G.B., **Csanádi Gy.**, Endre G., Kaló P. (1993). A lucerna géntérképezése IX. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Kállai L. (ed). Budapest, Kalliopé Bt.

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). A lucerna genetikai térképének megszerkesztése. In: X. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Kállai L. (ed). Budapest, Kalliopé Bt.

## 8.5. Könyvfejezet

C. Brummer, C.S. Echt, T.J. McCoy, K.K. Kidwell, T.C. Osborn, G.B. Kiss, **G. Csanádi**, K. Kálmán, J. Györgyey, L. Ökrész, A.E. Ráczkevy, J.H. Bouton, and G. Kochert (1993).  
Molecular Maps of Alfalfa. In: DNA-based Markers in Plants, Edited by I. Vasil and R. Philips,  
published by Kluwer Academic Publishers (Dordrecht)

## Tézisek II

### Az *in6* mutáció genetikai jellemzése diploid lucerna (*Medicago sativa* ssp. *coerulea*) növényben

#### I. Tudományos előzmények és célkitűzések

Összhangban az előzőekben leírtakkal, a genetikai térképezésen alapuló génklónozás alkalmazásával célul tűztük ki a szimbiotikus folyamatban szerepet játszó gének izolálását. E feladat megoldásához két dolog nélkülözhetetlen: egy molekuláris markereken alapuló részletes genetikai térkép elkészítése és a szimbiotikus funkcióban hibás mutáns növényi egyed izolálása.

Egy adott biológiai folyamat megismerését nagymértékben elősegíthetjük a folyamat valamely lépéséhez szükséges gén(ek)ben hibás mutánsok izolálásával és azok jellemzésével. A hibás gént hordozó egyed vizsgálatakor biztosak lehetünk abban, hogy a kérdéses gén nélkülözhetetlen szerepet játszik az adott folyamatban. ✓

A genetikai módszereken alapuló, mutáns izolálási és komplementálási eljárás - a biokémiai megközelítéssel összehasonlítva - a növényi genom nagy mérete miatt azonban nehezebb, hosszú időt és sok fáradságot igénylő munka. Gyorsabban érhetőek el eredmények a másik módszer, a cDNS génbankok differenciál- illetve szubtraktív hibridizálásán alapuló biokémiai megközelítés alkalmazásával. Ennek során *Rhizobium*mal fertőzött (vagy *Nod* faktórral indukált) növényekből készített cDNS génkönyvtárból izolálják azokat a klónokat, melyek nem találhatók meg az indukátlan kontroll növényekből készített cDNS géntárban. A ✓



világ számos laboratóriumában írtak le ezzel a módszerrel izolált korai és késői nodulin géneket, melyek közül csoportunk munkatársai a nodulin-25 késői nodulációs gént klónozták és jellemezték. Az előző fejezetekben említett korai nodulációs géneket is ezzel a módszerrel izolálták. Az ilyen módon klónozott génekről azonban csak annyit tudunk, hogy a szimbiózis során kifejeződnek, arról azonban, hogy van-e valamilyen funkciójuk a szimbiotikus folyamatban, csak feltételezésekkel rendelkezünk. A feltételezések szekvenenciaanalízisen és *in situ* hibridizációs adatokon alapulnak, melyek alapján e kérdést nem lehet megválaszolni. A probléma megoldásához elengedhetetlen a mutációt szenvedett gének azonosításán alapuló vizsgálat.

A szimbiotikus nitrogénkötési funkciójukban hibás növényi egyedek izolálása történhet indukált mutagenézissel, illetve természetesen előforduló mutációk azonosításával. Mostanáig számos pillangós fajból izoláltak mutánsokat, melyeket keresztezések segítségével genetikailag jellemezték. A gümőképzési, illetve a szimbiotikus nitrogénkötési hatékonyság megváltozása alapján három kategóriába sorolhatjuk a növényi mutánsokat.

Az egyik csoportba azok tartoznak, melyek nem képeznek gümőt effektív baktériumtörzs jelenlétében sem. Ezeket nevezzük gümőképzési (nodulációs, vagy  $Nod^-$ ) mutánsoknak. Ezek kétféleké lehetnek. Vannak olyanok, amelyeken a bakteriális fertőzést követően semmilyen válasz nem figyelhető meg, vagyis sem gyökérszôrgömbülés, sem kérgi sejtosztódás nem mutatható ki. Ide tartoznak például a szója *nod139* mutánsa, melyet *rj5 rj6*-nak is jelölnek, a borsó *sym8*-as és a lucerna MnNC-1008-as (NN-1008) mutánsa. A  $Nod^-$  mutánsok másik csoportját azok a növények alkotják, melyek nem képesek gümô kialakítására, azonban gyökérszôr deformáció illetve kérgi sejtosztódás indukálódása megfigyelhető. Többek között a szója *nod49* és *nod772* mutánsai tartoznak e kategóriába, melyek allélikusak a korábban már izolált *rj1* mutációval, valamint a borsó *sym2*-es mutánsa is e csoport tagja.

A növényi szimbiotikus mutánsok másik kategóriáját a gümôt kialakító, de szimbiotikus nitrogénkötésre vad típusú baktérium jelenlétében is képtelen nitrogénfixációs ( $Fix^-$ ) egyedek alkotják. Nitrátot nem tartalmazó közegben a nitrogénhiány következtében a növények zöldtömege kisebb, gümôjük a vad típusú rózsaszín gümôvel ellentétben fehér, és mutatják a klorózis jellegzetes tüneteit (pl.: levelek sárgulása). E mutáns-kategóriába tartoznak például a

szója *Rj2*, *Rj3*, *Rj4* mutációi, melyek dominánsan öröklődnek, a borsó és a lucerna *in1*, *in2*, *in3* és *in4in5* mutánsai, melyeket tetraploid vonalakban azonosítottak, és recesszív öröklődésűnek bizonyultak. Hasonlóképp recesszív öröklődésű a csoportunk munkatársai által izolált *M. coerulea* *Fix1/9* (*in6*) mutáns is.

Az eddig felsoroltak mellett harmadikként meg kell említeni az ún. "szupernoduláló" pillangósvirágú-mutánsokat is, melyekre az a jellemző, hogy hatékonyabb nitrogénkötésre képesek, mint a vad típusú egyedek, ezáltal zöld tömegük megnövekedik.

Ha már rendelkezünk meghatározott funkcióban hibás gént tartalmazó egyed(ek)el, a mutáció által érintett gén további vizsgálatához, funkciójának megismeréséhez elengedhetetlenül hozzátartozik az adott gén izolálása. Ezt a feladatot a térképezésen alapuló génizolálás módszerének alkalmazásával oldhatjuk meg.

Egy molekuláris markerek felhasználásával készült genetikai térkép segítségével a mutációt szenvedett gének helyzetét megállapíthatjuk a genomban. Ezt követően a hozzájuk legközelebb elhelyezkedő DNS-markereket kiindulási pontként használhatjuk a "genomséta"hoz", melynek segítségével az adott gént izolálhatjuk. A vad típusú gén mutáns növénybe történő transzformálásával elvégzett komplementációs kísérletekkel igazolhatjuk, hogy az izolált gén funkcionális.

Az utóbbi több, mint tíz évben igen elterjedt a molekuláris markerek alkalmazása a genetikai térképezésben. A Restrikciós Fragment Hossz Polimorfizmuson (Restriction Fragment Length Polymorphism v. RFLP), illetve a Random Amplifikált Polimorf DNS (Random Amplified Polymorphic DNA v. RAPD) technikán alapuló markerek használatának számos előnye van a klasszikus géntérképezéssel szemben. Egy több száz DNS-marker felhasználásával elkészített géntérkép lehetővé teszi egy adott gén térképhelyzetének pontos meghatározását. A nemrégiben kifejlesztett "kupacolási" technika felhasználásával pedig a keresett génhez nagyon közeli (< 10 cM) DNS-markerek izolálására van lehetőség, ami a génizoláláshoz szükséges genomséta útját jelentősen lerövidíti.

Az eukarióta szervezetekből történő génizolálás területén az utóbbi néhány évben elért eredmények igazolják azt az állítást, hogy a mutánsok szelekciója a genetikai térképezésen

alapuló génizolálással párosítva egyedülálló lehetőséget biztosít funkcionális eukarióta gének azonosításához és jellemzéséhez.

Csoportunkban Dr. Kiss György Botond vezetésével kezdődtek meg a lucerna szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő génjeinek megismerését célzó kutatások. E munka során megszerkesztettük a diploid lucerna molekuláris markereken alapuló térképét, és, szimbiotikus funkcióban mutáns lucernanövényeket izoláltunk.

Mutánsok izolálása céljából lucerna magok kobaltbesugázással történő mutagenéziséből származó szimbiotikus nitrogénfixálási képességben hibás ( $\text{Fix}^-$ ) növényt azonosított Dr. Kiss György Botond munkatársaival a diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* lucernapopulációban. Az izolált mutánst elnevezték *Fix1*-nek (*McIN6*), a mutációt szenvedett gént pedig *fix1*-nek (*in6*). A mutáns növénnyel számos keresztezési kísérletet végeztek. E vizsgálatokkal igazolták, hogy a mutáció monogénesen, recesszív módon öröklődik. Emellett mikroszkópos analízist végeztek a kialakult gümökön, és megállapították, hogy a mutáció jellege hasonló a tetraploid lucernából izolált *in2* és *in3* mutánsokhoz.

## II. Alkalmazott kísérleti módszerek

A kísérleteinket az első részben leírtakkal megegyező növényi anyagon végeztük el. Az *Mc* növény magjain történő kobaltbesugárzást követően (M1) meghatároztuk a magok csírázási százalékát, majd a magok felét M2 populáció előállításához használtuk fel.

A növények nitrogénfixálási képességének meghatározását Gibson-táploddattal locsolt perlitet tartalmazó cserepekben végeztük. Az inokuláláshoz a *Rhizobium meliloti* AK631 törzset használtuk. A kísérletek során vizsgáltuk a nitrogénfixáció sérülésekor jelentkező alapvető fenotípusokat: a lassabb növekedést, a levelek sárgulását valamint a szárazsúly-csökkenést.

A DNS-technikákon alapuló térképezési eljárás során az első részben tárgyaltaknak megfelelően jártunk el. Kísérleteinkhez a Southern-hibridizációt és a PCR-amplifikációt használtuk, valamint a szintén a PCR eljáráson alapuló RAPD-technikát alkalmaztuk.

A mutáns gén öröklődését különböző keresztezésekben vizsgáltuk. A mutáns növényt önbeporoztuk, valamint kereszteztük mind vad típusú *M. sativa* ssp *coerulea*, mind pedig vad típusú *M. sativa* ssp *quasifalcata* növényekkel. Az Mq növénnyel való keresztezésből származó F1 illetve F2 utódnemzedéket használtuk a gén térképhelyzetének meghatározásához. Az e populációban kapott kapcsoltsági adatokat a *térképtranszfer* módszer alkalmazásával átvittük a lucerna genetikai térképének elkészítéséhez használt F2 populációra, ahol az egyes markerek helyzetét pontosan meghatározhattuk.

### III. Az eredmények összefoglalása

#### A lucerna *in6* mutánsának jellemzése

A *M. sativa* ssp *coerulea* magpopulációból származó McIN6 növényi egyed *Rhizobium meliloti* AK631 baktérium jelenlétében képtelen a légköri nitrogén hatékony megkötésére. A mutáns növény nitrogénmentes táptalajon vad típusú *Rhizobium meliloti* jelenlétében a nitrogénhiány jellegzetes tüneteit mutatja. A növekedés visszamaradott, a virágkialakulás gátolt és a levelek színe sárga. A növényt kötött nitrogént tartalmazó táptalajon is neveltük, hogy meggyőződhessünk róla, hogy csak szimbiotikus funkciója sérült. Ilyen körülmények között az McIN6 növény normálisan növekedett, virágot fejlesztett és ön- illetve idegenbeporzását köveiben magokat hozott. Számunkra ez azt jelentette, hogy a mutációért felelős gén nem az általános anyagcsereútvonalban résztvevő fehérjét kódol, hanem olyat, amely nagy valószínűséggel a szimbiotikus folyamatban játszik szerepet.

Megállapítottuk, hogy kötött nitrogén nélkül *R. meliloti* AK631 jelenlétében a növény számos fehér, úgynevezett ineffektív gümbszövet képez.

Kísérleteinkből az is kiderült, hogy a mutáns homozigóta növények - ellentétben az AK631 törzssel - az RM41-es baktériumtörzssel (mely az AK631  $\beta$ se) hatékony szimbiózisra képes gümbsz alakít ki. Mindkét baktériumtörzs hatékony nitrogénkötésre képes vad típusú lucernával.

### Az *in6* mutáció genetikai analízise

Az *in6* mutációt genetikai keresztezésekben vizsgáltuk. Az McIN6 növény Fix- jellege vegetatív és generatív (önbeporzás) kezelések után is megmaradt.

Az McIN6 növény Mcw2 vad típusú lucernával való keresztezése során az összes keletkezett F1 egyed képes volt nitrogénkötésre, vagyis Fix+ fenotípust mutatott. Ez a mutáció recesszív jellegét bizonyította.

Az F1 növénynek önbeporzása során a mutáció egygénes normál mendeli öröklésmentet (szegregációt) mutatott.

Az *in6* mutáció térképezése céljából az McIN6 növényt kereszteztük a sárgavirágú *M. sativa* ssp. *quasifalcata* (Mq) növénnyel is. Ezáltal lehetővé vált a lucerna genetikai térképének elkészítése során felhasznált molekuláris markerek alkalmazása a gén térképezésére. A gén helyzetének meghatározásához két lehetséges megközelítés kínálkozott. Egyrészt kapcsoltságot kerestünk már térképezett markerek és az *in6* gén között, másrészt olyan markereket igyekeztünk azonosítani, melyek térképhelyzete ugyan ismeretlen, viszont kapcsoltságot mutatnak az *in6* génnel. A sikeres térképezés előfeltétele volt, hogy az azonosított marker mindkét térképező populációban (S1F1/McxMq és S1F1/McIN6xMq) szegregáljon.

Munkánk során 16 ismert térképhelyű RFLP és 24, hasonlóképp ismert térképhelyzetű, RAPD marker kapcsoltságát vizsgáltuk az *in6* génnel. Ezek a markerek 20 cM intervallumokban az akkor általunk térképezett genom 70%-át lefedték.

A másik megközelítés során eddig még nem térképezett markerekkel kerestünk kapcsoltságot. E kísérlet eredményeképp megállapítottuk, hogy az OPE7X nevű RAPD marker kapcsoltságot mutat az *in6* génnel. Ezután térképtranszfer alkalmazásával meghatároztuk az OPE7X marker térképhelyzetét az általunk készített lucerna genetikai térképen: a marker a 7. kapcsoltsági csoportba térképeződött, az UO69 és L83 RFLP markerek közé. Ebből az eredményből levonhattuk a következtetést, hogy az általunk vizsgált *in6* gén szintén ebben a genomrégióban helyezkedik el.

Összefoglalva: munkánk során jellemeztük a szimbiotikus nitrogénkötési funkcióban hibás McIN6 *Medicago sativa* ssp. *coerulea* növényt. Genetikai analízissel megállapítottuk, hogy a mutáció egy gént érintett, amely mendeli szegregációt és recesszív öröklődésmentet mutat. Genetikai térképezés segítségével megállapítottuk, hogy a gén az általunk szerkesztett lucerna genetikai térkép 7. kapcsoltsági csoportjára térképeződik.

Jelen munkából ezidáig közlemény nem jelent meg. A hiányzó kísérletek elvégzése után az eredményeket a megfelelő szakfolyóiratban közzétesszük; a kézirat jelenleg szerkesztés alatt áll.

## Tézisek III

### A Bcl-2 és Bcl-X<sub>L</sub> fehérjék funkciójának vizsgálata egér sejt kultúrában

#### I. Tudományos előzmények és célkitűzések

A programozott sejthalál, másnéven *apoptózis*, a sejtek aktív „öngyilkossági“ funkciója, mely a fiziológiásan felesleges sejteket megsemmisíti. Az apoptózis folyamata eltér a másik alapvető sejthalál-típustól, a *nekrozistól*, vagy más néven patológiás sejthaláltól, mely nem része egy szervezet normális fejlődési programjának. Az apoptózis fontos szerepet játszik mind az egészséges szövetkifejlődésben, mind pedig a már kialakult szövetek fenntartásában. Az eddigi kísérletek alapján valószínű, hogy e mechanizmus minden soksejtű organizmusban előfordul. A sejtosztódás és a programozott sejthalál, úgy tűnik, pontosan ki vannak egyensúlyozva, ami egy adott környezetben az optimális szövetstruktúra fenntartását szolgálja. Ismereteink szerint, sok esetben e kényes egyensúlyban bekövetkezett változás áll számos humán betegség hátterében.

Az apoptotikus folyamat univerzalitása ellenére igen kevésbé ismertek azok a mechanizmusok, amelyek programozott sejthalálhoz vezetnek. Az már ismert, hogy ez egy aktív, energiaigényes folyamat, amely sejten belüli endonukleázok aktiválásában kulminál. Ez a kettősszálú DNS fragmentálódását és a genetikai anyag felbomlását eredményezi. Az apoptotikus sejteket ultrastrukturálisan a sejtmembrán feloldódása, sejtsugorodás és magi fragmentálódás jellemzi, de más, sejten belüli organellek, mint pl. a mitokondrium és lizoszómák, viszonylag épek maradnak. Különböző soksejtű szervezetekben, mint *C. elegans* vagy *Drosophila* sikerült mostanáig azonosítani az apoptotikus mechanizmus egyes elemeit, és igazolni, hogy a mechanizmus evolúciósan erősen konzervált. Ez magában foglalja a folyamatot elindító

molekulákat, mint a *reaper* Drosophilában, vagy a *ces* család tagjai *C. elegans*-ban; a sejthalál „végrehajtó“ molekuláit, mint pl. az ICE cisztein proteázok családjának egyes tagjait, melyek közül legjelentősebbek a *ced-3* *C. elegans*-ban, az *Ich-1* és *CPP-32β* emlősökben.

Az apoptotikus folyamat végrehajtásának képessége nagy valószínűséggel minden sejt velejárája. A döntés, hogy a sejt meghaljon-e vagy sem, egyes külső szignálok és az adott sejt „halálszignálra“ való aktuális fogékonysága közötti kölcsönhatás során születik meg. Például a CD4+8+ kérgi thymocyták különösen érzékenyek számos apoptotikus stimulusra, míg a sokkal érettebb medulláris thymociták ellenállóak. Ez az ellenállóképesség korrelál a Bcl-2 fehérje megemelkedett expressziójával.

A Bcl-2, melyet eredetileg a B-sejtek folliculáris limfómájának t(14;18) töréspontjánál azonosítottak, számos apoptotikus stimulus hatását képes ellensúlyozni. A Bcl-2 egy folyamatosan növekvő fehérjecsalád „alapító tagja“. A család tagjai között meglévő homológia alapvetően két erősen konzervált régióra koncentrálódik, az ún. Bcl-2 homology 1 (BH1) és 2 (BH2) elemekre. E család tagja a Bax is, egy Bcl-2 homológ, mely önmagával és a Bcl-2-vel is dimert alkothat, és ha túltermelődik, gátolja a Bcl-2 funkcióját. A Bcl-2, illetve funkcionális homológja a Bcl-X<sub>L</sub> BH1 és BH2 régiójába eső különböző mutációk megakadályozzák a Bax-al való heterodimerizációt, ezáltal a Bcl-2 és a Bcl-X<sub>L</sub> nem tudja funkcióját ellátni. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a Bcl-2 és a Bcl-X<sub>L</sub> a Bax-al való heterodimerizáció segítségével fejtik ki antiapoptotikus hatásukat. Ez a feltételezés magában foglalja, hogy a (pl. Bax/Bax, Bcl-2/Bcl-2) homo- illetve a (pl. Bax/Bcl-2) heterodimerek aránya a sejt apoptotikus stimulusra való érzékenységének fő meghatározó tényezője.

Mivel a 25 kD Bcl-2 fehérje aminosavszerkezete nem ad magyarázatot a lehetséges funkcióra, az utóbbi időben két fő irányban folytak kutatások e kérdés megválaszolására. Az egyik a fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatával kívánja megadni a választ e kérdésre. Bár az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a fehérje a mitokondriális membránban lokalizálódik, mindeközül nem sikerült kizárólagosan bizonyítani, hogy ez a lokalizáció elengedhetetlen feltétele a Bcl-2 antiapoptotikus működésének.

A másik megközelítés a Bcl-2 sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálatával keresi a választ a kérdésre. Az elmúlt néhány évben számos vizsgálat bizonyította, hogy a sejtciklus egyes elemeinek összerendezetlensége apoptózishoz vezet, melyet a Bcl-2 gátolni képes. Számos sejtciklus-összetevő (ciklinek, p34<sup>cdc2</sup>, onkogének) programozott sejthalálra gyakorolt hatása mellett a Bcl-2 sejtciklusra kifejtett közvetlen hatását is vizsgálták. A számos összegyűlt adat alapján azt a következtetést vonták le, hogy a nem megfelelő sejtosztódási szignál apoptózist





indukál, és a Bcl-2 a ciklin-függő kinázok aktivitására gyakorolt közvetett hatáson keresztül képes gátolni a sejtciklust.

Azonban felvetődik a kérdés, hogy vajon a sejtciklus nem megfelelő indukálása általánosan és kizárólagosan szükséges-e az apoptózis kiváltásához, illetve hogy a Bcl-2 kizárólagosan a sejtciklus befolyásolásával fejt-e ki hatását. Hőérzékeny p34<sup>cdc2</sup> mutánsokkal, illetve sejtmag-eltávolított vonalakkal végzett kísérletek bizonyítják, hogy az apoptózis a sejtciklus-alkotóelemek nélkül is végbemegy. A nem megfelelő sejtciklus-iniciálás tehát elindíthatja a programozott sejthalált, viszont valószínűleg nem ez a folyamat végső közös kiváltója. Úgy tűnik inkább, hogy a különböző apoptotikus szignálok egy citoplazmatikus szabályozóelem felé konvergálnak, amely megindítja az apoptózist.

Laborvezetőm, Oltvai Zoltán, munkatársaival korábban számos vizsgálatot végzett a Bcl-2 és a sejtciklus kapcsolatának tisztázására. Ennek során vizsgálták a fehérje foszforilációját (i), szubcelluláris lokalizációját (ii), valamint a sejtciklusra gyakorolt hatását (iii).

(i) Humán Bcl-2 génnel transzformált, a Bcl-2 fehérjét túltermelő egér sejtvonalakkal végzett kísérletek eredményeképp megállapították, hogy az interleukin-3 (IL) növekedési faktor jelenlétében a sejt endogén Bcl-2 fehérjéje nem, míg a transzformációval bejuttatott és túltermelt humán fehérje erősen foszforilálódik. Az is kiderült, hogy amennyiben IL-3 nincs jelen - ami egy erős apoptotikus szignál - a foszforiláció mértéke jelentősen gyengül. A fehérjefoszforiláció szerepét több szempontból is vizsgálva, immunprecipitációs kísérletekkel kimutatták, hogy a Bcl-2 fehérje foszforilált formában is képes heterodimert képezni a Bax-al, tehát a fehérje ezen funkciója nem változott.

(ii) Felvetődött annak a lehetősége is, hogy a foszforiláció megváltoztatta a fehérje térszerkezetét, tehát hatással lehet annak szubcelluláris lokalizációjára. A kérdés megválaszolására szubcelluláris frakcionálást végeztek, és vizsgálták a Bcl-2 jelenlétét a különböző frakciókban. Eredményként azt kapták, hogy a foszforilálatlan formától eltérően a foszforilált Bcl-2 majdnem kizárólagosan a citoszólban lokalizálódott. A foszforiláció tehát drasztikusan megváltoztatta a fehérje szubcelluláris lokalizációját, míg a Bax-al való heterodimerizációra nem volt hatással. ✓

(iii) A kérdés ezek után az, hogy vajon mi a fiziológias jelentősége a Bcl-2 foszforilációjának és defoszforilációjának. Figyelembe véve azt a már ismert tényt, hogy IL-3-megvonással kezelt

sejtvonalakban a Bcl-2 túltermelése lassítja az IL-3 visszaadást követően a sejtek sejtciklusba való belépését, egy lehetséges magyarázat, hogy a Bcl-2 foszforilációja és/vagy megváltozott szubcelluláris lokalizációja megváltoztatja a fehérje ezen késleltető-funkcióját. Bcl-2-túltermelő sejtvonalak sejtciklusparamétereit vizsgálva megállapították, hogy a Bcl-2 nemcsak a ciklusba visszalépő, hanem a már aktívan osztódó sejtekben is gátolja sejtosztódást.

Mivel a sejtosztódás gátlása számos esetben elegendő az apoptotikus szignálokkal szembeni védelemhez, és mivel ez a funkció megegyezik a Bcl-2 fehérje alapvető szerepével, felvetődik a kérdés, vajon a fehérje a sejtciklus gátlásán keresztül fejti-e ki antiapoptotikus hatását, avagy a sejtciklus-gátlás és az antiapoptotikus funkció a fehérje két, egymástól teljesen független tulajdonsága. E kérdés megválaszolását a vad típusú (wt) Bcl-2 illetve ennek antiapoptotikus funkciójában sérült, MI-2 elnevezésű, BH1 szubsztitúciós mutánsának sejtosztódási paramétereit hasonlítottuk össze. Hogy eredményeinket a Bcl-2 család más tagjaira is általánosíthassuk, parallel kísérleteket végeztük a BclXL-el, a Bcl-2 fehérje egy funkcionális homológjával és ennek MI-3 nevű BH1 szubsztitúciós mutánsával is. Feltevésünk az volt, hogy amennyiben a BH1 szubsztitúciós mutánsok, melyek nem képesek antiapoptotikus funkcióra, a vad típusú fehérjékhez hasonló mértékben gátolják a sejtosztódást, az antiapoptotikus és sejtciklusgátló funkciók függetlenek kell legyenek egymástól.

## **II. Alkalmazott kísérleti módszerek**

Kísérleteinket a mutáns (FL5.12-MI-2 Bcl-2 [cl. 14]), illetve vad típusú humán Bcl-2-t (FL5.12-wt Bcl-2), valamint mutáns (FL5.12-M-3 BclXL [cl. 19]) és vad típusú humán BclXL-t (FL5.12-wt BclXL[cl. 18]) összehasonlítható mennyiségben kifejező egér FL5.12 B-sejtkultúrákkal végeztük. Kontrollként Bcl-2-vel nem transzformált, neomicin- rezisztenciagént tartalmazó FL5.12 Neo sejteket használtunk. A sejtvonalakat előzetes kísérletekben meghatározott módon, a sejtek életbenmaradásához minimálisan szükséges 25 IU/ml IL-3 jelenlétében tartottuk fenn.

A sejtekben IL-3 megvonással indukáltuk az apoptotikus folyamatot. A lecentrifugált sejteket többször mostuk Iscove's oldattal, majd a sejteket IL-3 mentes, módosított Dulbecco-táptalamban növesztettük tovább.

Minden kísérletben vizsgáltuk a sejtszámváltozást, az apoptotikus és az egészséges sejtek számát, valamint flow cytometriás eljárással meghatároztuk a sejtciklus-paramétereket. A sejtszámolást Bürker-kamra segítségével végeztük, az apoptotikus sejtek számát pedig tripánkék-festésen alapuló életképesség-vizsgálattal állapítottuk meg.

A flow-cytometriás mérésekhez a kezelt sejteket lecentrifugáltuk, majd PBS-es mosás után propidium jodiddal festettük és analizáltuk őket.

### **III. Az eredmények összefoglalása**

i. megállapítottuk, hogy mind a wt Bcl-2, mind pedig a wt Bcl-X<sub>L</sub> és ezek mutánsait tartalmazó sejtek még IL-3 jelenlétében is csökkent mértékű sejtciklus-aktivitást mutattak a kontrollként használt Neo-sejtekhez képest. A sejtek megkettőződése szintén hosszabb időt vett igénybe a Bcl-transzformáns klónokban.

ii. az IL-3 megvonás első tizenkét órájában a sejtszám nem változott, és a sejtek főképp a sejtciklus G1 fázisában akkumulálódtak. A mutáns és vad típusú Bcl-2 sejtek nemcsak a G1, hanem a G2/M átmenetnél is jelentősen felhalmozódtak.

iii. negyvennyolc órával az IL-3 megvonás után a mutáns fehérjéket tartalmazó klónok és a kontroll sejtek többsége elvesztette életképességét, az életbenmaradtak legtöbbször a G1 stádiumban maradt. Ugyanakkor a vad típusú és mutáns Bcl-2 sejtek aránya továbbra is magasabb volt a G2/M-ben, mint a kontrollban, illetve a Bcl-X<sub>L</sub>-t expresszálóakban.

iv. Mivel a kontroll Neo sejtek tizenkét órával az IL-3 megvonás után még életképesek voltak, az interleukin megvonást követő tizenkettedik órában IL-3-at adtunk az összes sejt kultúrához. Tizenkét órával a visszaadást követően a Bcl-klónok elsődlegesen a G1 (Bcl-X<sub>L</sub> és mutánsa), valamint a G1 + G2/M fázisban voltak, ellentétben a kontroll Neo-val, amely már az S-fázisba belépett. Az S-fázisba lépést követő tizenkét órában a kontroll Neo sejtek száma rohamosan megnőtt. Huszonnégy órával a visszaadást követően a Bcl-klónok késleltetve, de

kimutathatóan beléptek az S-fázisba, későbbi sejtszámnövekedés nélkül. Megjegyzendő, hogy a wt Bcl-XL minden esetben erősebb sejtciklusgátlást eredményezett, mint a wt Bcl-2.

v. Kísérleteink során felvetődött annak lehetősége, hogy a gátlást a túl alacsony citokinin-koncentráció eredményezheti. Ennek kizárására különböző IL-3 koncentrációban nevelt sejtek sejtciklusparamétereit vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a magasabb IL-3 koncentráció, még a telítési értéket elérve is, ugyan elősegíti a sejtproliferációt, de a Bcl-fehérjék okozta gátlást megakadályozni nem képes.

Összefoglalásképp megállapíthatjuk, hogy kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a Bcl-2 és a Bcl-XL sejtciklusgátló és antiapoptotikus funkciója elválaszthatók egymástól, ebből következően a fehérjék két különböző funkcióval rendelkeznek: apoptózis gátlással és sejtciklus-blokkoló képességgel. Tehát a fehérjék nem kizárólagosan a sejtciklus gátlásának mechanizmusával hajtják végre antiapoptotikus funkciójukat.

## **Tudományos közlemény**

**Béla Taródi, Gyula Csanádi and Zoltán N. Oltvai: Restriction of cell proliferation as an independent function of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>**

In preparation

## Hivatkozások:

### I.

Scheres B., van de Wiel C., Zalensky A., Horvath B., Spaink H., van Eck H., Zwartkuis F., Wolters A.M., Gloude-mans T., van Kammen A., and Bisseling T. (1990): The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction  
Cell **60**: 281-294

Löbler M., Hirsch A.M. (1993). A gene that encodes a proline-rich nodulin with limited homology to PsENOD12 is expressed in the the invasion zone of *Rhizobium meliloti*-induced alfalfa root nodules.  
Plant Physiol. **103**:21-30

### II.

Mathews A., Carroll B.C., Bauer W.D., Gresshoff P.M. (1986): rj6- a new gene conditioning non-nodulation in soybean.  
In: Proceedings of The Eight Australian Nitrogen Fixation Conference. Adelaide, Australia. Wallace W., Smith S.E. (eds.). Appendix1

Markwei C.M., LaRue T. (1992): Phenotypic characterization of sym8 and sym9, two genes conditioning non-nodulation in *Pisum sativum* „Sparkle“.  
Ca. J. Microbiol. **38**:548-554

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

### III.

Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., and Thompson C.B. (1993): bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.  
Cell **74**:597-608

Williams G.T., and Smith C.A. (1993): Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death.  
Cell **74**:777-779

Yin X.M., Oltvai Z.N. and Korsmeyer S.J. (1994): BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.  
Nature **369**:321-323