

**Transzgenikus módszerek fejlesztése és alkalmazása a
NORK gén szimbiotikus kapcsolatok kialakulásában
betöltött szerepének vizsgálatára**

Ph.D. értekezés tézisei

Perhald Ariana

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet

Témavezető: Kereszt Attila, Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem, 2008

Bevezetés

A pillangósvirágú növények szimbiotikus kapcsolatot alakítanak ki a *Rhizobiaceae* családba tartozó talajlakó baktériumokkal. A pillangós-rhizobium szimbiózisra jellemző egy új szerv, a gyökérgümő kialakulása a növények gyökerén, melyben a baktériumok végzik a légköri nitrogén (N₂) redukcióját cserében a Nap fényenergiáját használó fotoszintézis során beépített szén-dioxidból előállított tápanyagokért.

A szimbiotikus kapcsolat kialakulásához, működéséhez és regulációjához elengedhetelen gének megismerésének leghatékonyabb módja a klasszikus genetikai megközelítés, melynek során a folyamatban hibás mutánsok segítségével azonosítjuk az érintett géneket.

A különböző tetraploid lucernafajták (*Medicago sativa*) keresztezésével előállított utódpopuláció egyedei között azonosított, gümőképzésre képtelen (Nod⁻) MnNC-1008(NN) (Peterson and Barnes 1981; Barnes et al. 1988) vonal volt az egyik elsőként azonosított szimbiotikus mutáns (Caetano-Anolles and Gresshoff, 1991). Ez a mutáns képtelen az összes jellegzetes, a rhizobiumok illetve a bakteriális jelmolekulák, a Nod faktorok által kiváltott válaszreakciók megjelenítésére. Mi több, ez a növény a foszformobilizáló mycorrhizás szimbiózis kialakítására is képtelen (Bradbury et al. 1991). A szimbiotikus kapcsolatok kialakításához elengedhetetlen gént az MTA Genetikai Intézetének Lucerna Genetika Csoportja térképezésen alapuló klónozással izolálta és egy NORK-nak (Nodulation Receptor Kinase)

elnevezett receptor-szerű protein kinázt azonosított (Endre et al. 2002a; 2002b). A térképezésen alapuló klónozás utolsó lépése lett volna az MN-1008 mutáns komplementálása a vad típusú *NORK* génnel. Ezt azonban nem lehetett megvalósítani a gyors, *Agrobacterium rhizogenes* segítségével végrehajtott transzformáció segítségével, ugyanis a képződött transzformált gyökereken (hairy roots) nem képződnek szimbiotikus gümők (Beach and Gresshoff 1988). Mi több, a tradicionális, *A. tumefaciens* segítségével végzett transzformációs módszert sem lehetett alkalmazni, mert az MN-1008 vonal nem embriogén.

Célkitűzések

1. Új, alternatív komplementációs stratégiák segítségével a *NORK* gének a szimbiotikus kapcsolatok kialakulásában betöltött nélkülözhetetlen szerepének igazolása.

2. A *NORK* gén kifejeződésének és regulációjának vizsgálata a célból, hogy feltárhassuk a gümőképzés során betöltött potenciális funkcióit.

Módszerek

- *Agrobacterium rhizogenes* segítségével megvalósított növénytranszformáció

- *Agrobacterium tumefaciens* segítségével megvalósított növénytranszformáció

- DNS izoláció és hibridizáció

- PCR analízis
- Reverz transzkripció (RT-) PCR analízis
- β -glükuronidáz (GUS) aktivitás hisztokémiai lokalizálása

Eredmények és megvitatásuk

***NORK* mutációk komplementálása más fajokban**

Mivel sem az *A. rhizogenes* sem az *A. tumefaciens* segítségével végrehajtott növénytranszformációval sem volt megvalósítható az MN-1008 vonal komplementálása, a közeli rokon faj, a *M. truncatula* ortológ génjében mutációt hordozó *dmi2* mutánsainak funkcionális komplementálását érték el a vad típusú *NORK* szekvenciának az *A. rhizogenes* segítségével történő bejuttatásával.

Alternatív stratégiák kidolgozása az MN-1008 vonal *Nod*⁻ fenotípust okozó mutációjának komplementálására

Kidolgoztunk egy eljárást, melyet sikeresen alkalmaztunk stabil transzformáns vonalak előállítására a nem embriogén MN-1008 lucerna vonal *Nod*⁻ fenotípust okozó mutációjának komplementálása céljából. A tetraploid *M. sativa* néhány fajtája képes szomatikus embriogenezisre, mely tulajdonságot – több vonal genetikai analízise alapján – legalább két gén domináns allélja határoz meg, melyek általában szimplex/szimplex (Aaaa/Bbbb) konfigurációban vannak a tesztelt embriogén vonalakban (Wan et al. 1988; Hernandez-Fernandez et al. 1989; Kielly and Bowly 1992; Crea et al. 1995). Megközelítésünk alapja az, hogy az

embriogenitást meghatározó gének domináns alléljei, a mutáns fenotípus, valamint a komplementációt biztosító vad típusú transzgén halmozni lehet egy egyedben több keresztezési és szelekciós lépés kombinálásával. Az itt leírt stratégiát általánosan alkalmazni lehet hasonló körülmények között, azaz amikor a transzformálni kívánt növény embriogenezisre képtelen, de a vizsgált fajból rendelkezésünkre áll(nak) embriogén vonal(ak).

Három stratégiát lehet használni egy nem embriogén növényi vonalban levő mutáció komplementálására: A komplementációra használandó DNS konstrukciót be lehet transzformálni egy embriogén vonalba, majd a transzgenikus és a mutáns növényt keresztezzük (route P= szülői út), vagy pedig a mutáns allél(ek)e)t keresztezéssel bejuttatjuk egy embriogén vonalba, melyet a hibrid F1 vagy az F2 (/BC) populáció embriogén egyedeinek transzformálása követ (F1 és F2 utak).

Az első alternatív út (Route P) során a vizsgálni kívánt gént az embriogén szülőbe (P_{WE}) transzformáljuk. A regenerált transzgenikus egyedeket kiválasztjuk (P_{ET}), majd keresztezzük a nem embriogén mutáns (P_M) vonallal, hogy egy növényben legyen jelen a mutáció és a transzgén. Azonosítjuk a transzgenikus F1 egyedeket ($F1_T$) és önbeporzással, vagy a mutáns növényvel történő visszakeresztezéssel szegregáló populációt állítunk elő. Utolsó lépésként a második utódgenerációban azonosítjuk azokat a transzgenikus egyedeket (I_{MT}), melyek homozigóta formában hordozzák a gén mutáns allélját. Az F1 és F2 utak (Routes F1 and F2) a nem embriogén mutáns (P_M) vonal és az embriogén szülő (P_{WE})

keresztezésével kezdődnek, mely után az embriogén heterozigóta egyedeknek (F_{1E}) a hibrid F1 populációból történő kiválasztása következik. Az egyik lehetséges következő lépés (Route F2) ezen F_{1E} hibrid növények önbeporzása, majd az embriogén, homozigóta mutáns egyedek (I_{ME}) kiválasztása az F2 populációból. A kívánt génkonstrukció(ka)t később *A. tumefaciens*-mediálta transzformációval be lehet juttatni ezen növényekbe. Ebben az esetben, mivel az embriogén mutáns növény a rendelkezésünkre áll, számos transzformációs kísérletet tervezhetünk különböző gének/génkonstrukciók tesztelésére. Ha a jelölt gén már a kezünkben van, akkor mód van az embriogén F1 egyedek idegen DNS-sel történő transzformálására (Route F1). A transzgenikus hibrid növények (F_{1T}) azonosítása után a transzgenikus, homozigóta mutáns növények (I_{MT}) előállításának lépései megegyeznek a "szülői út" (Route P) során leírtakkal.

A *NORK* gén mutáns alléljait hordozó embriogén F1 növények előállítása

Az eredetileg a nem embriogén MN-1008 lucerna növény által hordozott mutáció komplementálása valamint a módszer gyakorlatban történő kipróbálása céljából a térképezésen alapuló génklónozás térképezési és szekvenálási munkáival párhuzamosan végrehajtottuk az F1 és F2 utak közös kezdeti lépéseit. Akkor, a jelölt gén hiánya miatt a "szülői út" (Route P) megvalósításának lehetőségét elvetettük. Első

lépésként a Nod^+ és Nod^- allélokat heterozigóta konfigurációban hordozó, embriogén F1 növény (F_{1E}) előállítására céljából kereszteztük a nem embriogén, Nod^- MN-1008 mutánst (P_M) a nagyon embriogén, Nod^+ Regen S szülővel (P_{WE}). Az utódok hibrid jellegét a keresztezés irányától függően gümőképzési teszttel illetve hibridizációval ellenőriztük.

Az F1 hibridek közül azonosítottuk azokat az egyedeket (F_{1E}), melyek képesek voltak szomatikus embriók létrehozására, s közülük kiválasztottunk egyet, melynek az volt az előnyös tulajdonsága, hogy önbeporzás után nagy mennyiségű magot, azaz nagy utódgenerációt tud létrehozni. Ez az embriogén F1 vonal kétféle lehetőséget kínált a stabil transzgenikus vonalak előállítására, a transzgen általi komplementáció vizsgálatára.

Az F2 stratégiát követve az F1 növény önbeporzásával előállítottuk a második utódgenerációt, melynek egyedei közül kiválasztottuk azokat a növényeket, melyek homozigóták voltak a Nod^- tulajdonságot hordozó genomi régióra nézve. Meglepetésünkre, ezen mutáns növények közül egyetlen egy sem volt képes szomatikus embriogenezisre. Egy lehetséges magyarázata lehet az embriogén mutáns egyedek (I_{ME}) hiányának, hogy az embriogenitáért felelős gének egyike genetikailag szorosan kapcsolódik a *NORK* génhez, s a populációban nem találtunk olyan mutáns egyedet, mely a megfelelő (azaz az embriogenitáért felelős domináns és mutáns *NORK*) alléleket hordozó rekombináns kromoszómával rendelkezett volna.

Az embriogén F1 növények transzformációja

A jelölt gén azonosítása után az *nn1* mutáció komplementálására az F1 stratégiát (Route F1) követtük, s a *M. truncatula* vad típusú *NORK* génjét transzformáltuk az embriogén F1_E növénybe.

Az elsőként regenerált növényeket DNS–DNS hibridizációval teszteltük, hogy genomjukban a transzgén jelenlétét kimutassuk, kópiaszámát meghatározzuk. Restrikciós enzim emésztéssel kapcsolt reverz transzkripció (RT-) PCR amplifikációval kimutattuk, hogy a vad típusú *M. truncatula* *NORK* (*MtNORK*) gén minden vizsgált F1_{ET} növény gyökérszövetében kifejeződött.

A vad típusú transzgént hordozó homozigóta mutáns növények azonosítása

A legnagyobb magtermelő képességgel rendelkező transzformált F1_{ET} egyedek és klónjait választottuk ki az F2 populáció létrehozására. Önbeporzás után 727 magot gyűjtöttünk össze és vetettünk el, közülük 622 F2 növény nőtt fel, melyeket analizáltunk. Egy a mutációval szorosan kapcsolt, PCR alapú genetikai markert használtunk azon hét F2 egyed kiválasztására, melyek a Nod régióban, azaz a *NORK* gén szomszédságában megfelelő (mutáns) homozigóta genotípussal rendelkeznek.

A mutáns allélek homozigóta konfigurációjának igazolására, valamint a vad típusú *NORK* transzgén jelenlétének illetve távollétének

kimutatására hibridizációs kísérleteket végeztünk a hét növény genomialis DNS-ével egy *NORK* próba felhasználásával. A hat Nod^+ fenotípusú, de a mutációra homozigóta növény genomja hordozta a *M. truncatula* *NORK* génjét, míg a hetedik homozigóta, s Nod^- fenotípusú egyed genomjában nem lehetett kimutatni a transzgén jelenlétét. Ez a hibridizációs mintázat egyrészt azt bizonyítja, hogy a Regen S vonalból származó endogén, vad típusú *NORK* allél hiánya Nod^- fenotípust eredményez, másrészt a vad típusú *M. truncatula* *NORK* (*MtNORK*) transzgéngén felelős az MN-1008 genetikai háttér által meghatározott mutáns fenotípus komplementációjáért.

A *NORK* gén lehetséges szerepének vizsgálata génexpressziós vizsgálatokkal

A *NORK* gén sejt-specifikus expressziójának és regulációjának gyökérben és gyökérgümőben történő vizsgálata céljából a gén 3.1 kb hosszúságú promóter és 5' nem transzlálódó régióját a β -glükuronidáz (GUS) riportter gén elé klónoztuk. Ezt a hibrid gént bejuttattuk az *A. rhizogenes* Arqua törzsbe, melynek segítségével olyan kiméra *M. truncatula* növényeket állítottunk elő, melyekben a vad típusú hajtások transzgenikus gyökerekkel rendelkeztek.

Kimutattuk, hogy a *NORK* gén a gyökércsúcsot kivéve a gyökér teljes hosszában kifejeződik az epidermiszben és a kéregben, s a legmagasabb expressziót az oldalgyökerek fiatalabb részében figyeltük meg. A gümőképzés során a gén erősen indukálódott a gümő-

primordiumokban, magas kifejeződési szintet mutatott összehasonlítva a környező szövetekkel illetve az újonnan fejlődő oldalgyökerekkel. A *NORK* gén indukcióját már két nappal a baktérium inokulációt követően meg lehetett figyelni a kéreg sejtcsoportjaiban, ami a 3. és az 5. nap között tisztán a gümő-primordiumokra korlátozódott, majd fiatal kiemelkedő gümők központi, differenciálatlan sejtjeiben volt látható. A gümőfejlődés ezen szakaszában a *NORK* gén aktivitása inkább az *MtENOD20* (Vernoud et al. 1999), valamint az *MsENOD40-1* és *-2* (Fang and Hirsch 1998), mint az *MtENOD11* és *MtENOD12* gének expressziós mintázatára emlékeztet, melyek nem indukálódnak a primordiumokban. Azonban az *ENOD* gének azokban az epidermális és kéregsejtben is indukálódnak, melyekből az infekciós fonalak kiindulnak, illetve amelyeken keresztül haladnak (Journet et al. 2001; Pichon et al. 1992; Vernoud et al. 1999).

A *NORK* gén kifejeződésének lokalizációjára irányuló vizsgálataink arra utalnak, hogy a gén terméke speciális feladatot lát el a gyökér-kéregben és a gümőben is, mely megelőzi és melyre szükség van a baktériumok inváziójához. Egyetértésben az epidermiszben betöltött szerepével, ezek az eredmények alátámasztják azt az elgondolást, hogy bakteriális infekcióhoz vezető Nod faktor felismerésre és jeltovábbításra folyamatosan szükség van az indeterminált gümők fejlődése során.

Köszönetnyilvánítás

I would like to thank to my supervisor, Dr. Attila Kereszt for guiding me through roads I didn't even know that exist in the scientific field and for his support during the whole period of studies.

I want to thank to Dr. György Botond Kiss for his scientific guidance and for allowing me to study in his group though I didn't have experience in plant molecular biology work.

One of the persons who guided me in the conception and publication of my work is Dr. Gabriella Endre and I address her all of my thanks.

I have a lot of gratitude towards Zoltán Kevei for his help in reverse transcription (RT-) PCR analysis.

Also, I don't want to forget the help during the work with plants of Sándor Jenei, Liptay Zsuzsa, Erika Veres, Gyöngyi Somkúti Pálné and other members of the group and also their smile and encouragements when I needed.

I want to mention here the help of my lab colleagues Andrea Seres, Anita Lózsa, Katalin Vincze Kontár and Andrea Borbola and to thank them for being next to me.

Taras Pasternak helped me in the work with transgenic plants and I'm grateful to him.

A lot of thanks to my ITC friends and flatmates Ion Gabriela and Oana Sicora for helping and following me in the "jazz nights" and to

Erika Berezcki, Éva Korpos and the Genius team for their encouragements.

Finally, my family was all the time present in my soul wherever I went and to them I owe the way I am. I include here the thanks to my best friends' support, Julieta Lupu and Adriana Vescan.

This work was carried out in the Institute of Genetics, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary.

Közlemények jegyzéke:

Az értekezés témakörébe tartozó közlemények:

1. Perhald A, Endre G, Kevei Z, Kiss GB, Kereszt A. *Strategies to obtain stable transgenic plants from non-embryogenic lines: complementation of the nn1 mutation of the NORK gene in Medicago sativa MN1008*. Plant Cell Rep. 2006 Aug;(8):799-806.

IF: 2.173

2. Bersoult A, Camut S, **Perhald A**, Kereszt A, Kiss GB, Cullimore JV. *Expression of the Medicago truncatula DM12 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development*. Mol Plant Microbe Interact. 2005 Aug;(8):869-76

IF: 3.928

Összesített IF: 6.101

