

Tartalékfehérje gének transzkripciójának szabályozása egy gabona modellnövényben, *Brachypodium distachyon*-ban

NKFI K100881

Zárójelentés

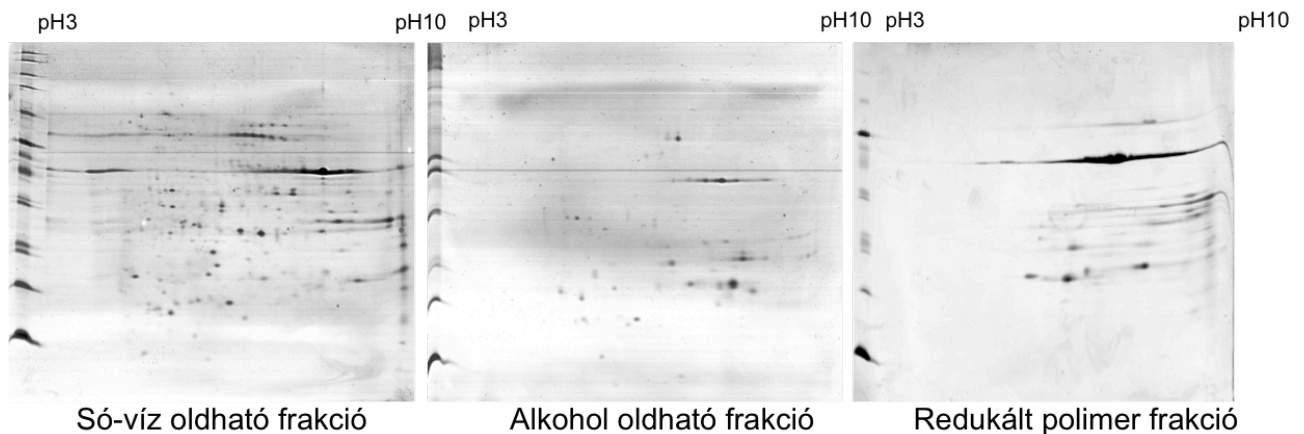
A gabonafélék tartalékfehérjéi táplálkozásunk egyik legfontosabb növényi fehérjeforrásaként szolgálnak. Ezen tartalékfehérjék közül a raktározási funkciót elsődlegesen a prolaminok és a globulinok látják el. Míg a búza és rokonsági körébe tartozó fajok esetében a prolaminok képezik a tartalékfehérjék legnagyobb mennyiségben expresszált csoportját, addig pl. rizsben a tartalék fehérje raktározási funkciót elsődlegesen 11S és 12S globulinok látják el. Előzetes ismereteink alapján a *Brachypodium distachyon* magjában mindkét tartalékfehérje típus termelődik, a prolamin-jellegű gének mennyisége azonban a globulinokénál kevesebb. A búza és a *Brachypodium* közötti evolúciós rokonságot tekintve feltételezhető volt, hogy a fűfélékben néhány ősi génből kialakuló prolamin típusok erős konzerváltságának köszönhetően transzkripció szabályozási mechanizmusaikban is hasonlóságot mutatnak. Ugyanakkor a model növény kisebb genomja révén kiváló lehetőséget nyújt a prolamin-jellegű gének expresszió szabályozásának nyomon követésére.

A pályázatban bioinformatikai, genomikai, proteomikai és molekuláris biológiai módszerek felhasználásával a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen típusú tartalékfehérje gének fordulnak elő a *Brachypodium*-ban, mennyire konzerváltak ezek a gén típusok kódoló gén illetve promoter szinten?
- Milyen cisz-szabályozó elemek fordulnak elő a prolamin gének promoter motívumaiban, milyen ezen motívumok eloszlása és mintázatuk milyen mértékben különbözik a búza tartalékfehérjék promoter elemeitől?
- Milyen időbeli és lokális sajátosságokkal rendelkezik az expressziójuk?
- A kapott eredmények alapján mennyiben különbözik a *Brachypodium*-ra jellemző tartalékfehérje expressziós modell a búzáétól.
- Milyen transzkripció faktorok vesznek részt a termelődésükben, ezek közül melyek játszanak szerepet szövetspecifikus termelődésben illetve melyek játszanak fontos szerepet az abiotikus stresszekre (pl. hő, szárazság) adott válaszok kialakulásában?

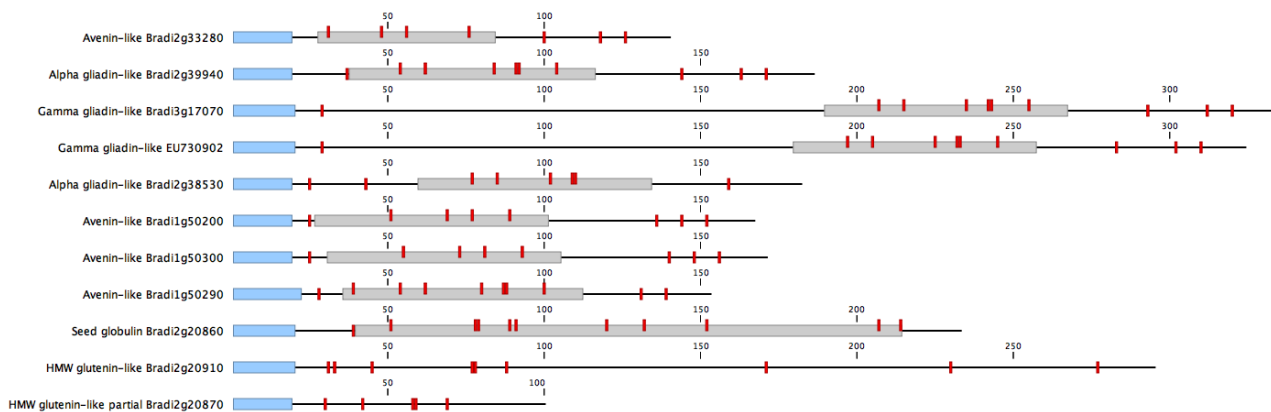
1.1 *Brachypodium distachyon* tartalékfehérjék proteomikai és bioinformatikai jellemzése és promotereinek vizsgálata

A *Brachypodium distachyon* magjában szintetizálódó tartalékfehérjék jellemzéséhez frakcionált fehérje extrakciót majd két dimenziós gélelektroforézist végeztünk. Az albumin-globulin jellegű fehérjéket először 0.5%-os NaCl oldattal extraháltuk, majd a centrifugálást követően a csapadékot 70%-os alkohollal rázattuk. Az alkohol oldható frakció maradványaként megmaradt csapadékot redukálószer jelenlétében 70%-os alkohollal újra extraháltuk. A három frakcióból kapott fehérjéket pH3-10 IPG stripen fókuszáltuk, majd 12%-os SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk (1.1.1 ábra).



1.1.1. ábra *Brachypodium* mag proteomja szekvenciális extrakcióval

A prolamin jellegű gének szekvencia szintű jellemzéséhez az annotált *Brachypodium* genom illetve proteom szekvenciákat használtuk. Az annotált genom adatok alapján a 'gene ontology' definíciók szerint tartalék fehérje funkcióval rendelkező fehérjék száma 120. Ezek magukban foglalják az albuminokat, a prolaminokat és a prolamin szupercsalád más tagjainak szekvenciáit is (non-specifikus lipid transzfer proteineket, alfa-amiláz inhibitorokat stb.). Az azonosított fehérjék a prolamin szupercsalád tagjain belül jellemző homológiánál kisebb hasonlóságot mutatnak a gabonafélék prolaminjaihoz (34-70%). Valamivel nagyobb hasonlóságot találtunk egyes fehérjék és zab aveninek között. A búza prolaminokhoz hasonlóan az azonosított fehérjék rendelkeznek egy ciszteinekben gazdag konzervált domainnel és a prolaminokra ugyancsak jellemző szignál-peptiddel. Az azonosított tartalékfehérje típusokat PR1 - avenin-jellegű, PR2 – HMW glutenin jellegű, PR3- alpha gliadin jellegű és PR4 – LMW glutenin/gamma gliadin jellegű csoportokba osztottuk. A vizsgált csoportok közül az avenin jellegű fehérjék fordultak elő a legnagyobb számban. A HMW glutenin-jellegű fehérjék a búza nagy molekulatömegű (HMW) gluteninjeitől eltérően sokkal rövidebb szekvenciával rendelkeznek. Szekvenciájukban csak részlegesen hasonlítanak a HMW glutenin alegységfehérjékre, ugyanakkor nagyobb hasonlóságot mutatnak egyes globulinokhoz. A gamma illetve az alfa gliadin jellegű szekvenciák, valamint az avenin-jellegű fehérjék egyaránt tartalmazzák a kénben gazdag prolaminokra jellemző gliadin pfam domaineket (1.1.2. ábra).



1.1.2. ábra Néhány prolamin jellegű *Brachypodium distachyon* fehérje szekvenciájának összehasonlítása. A szürke sávok a konzervált fehérje domaineket, a világoskék sávok a szignál peptidet, míg a pirossal jelzett sávok a cisztein aminosavakat jelzik.

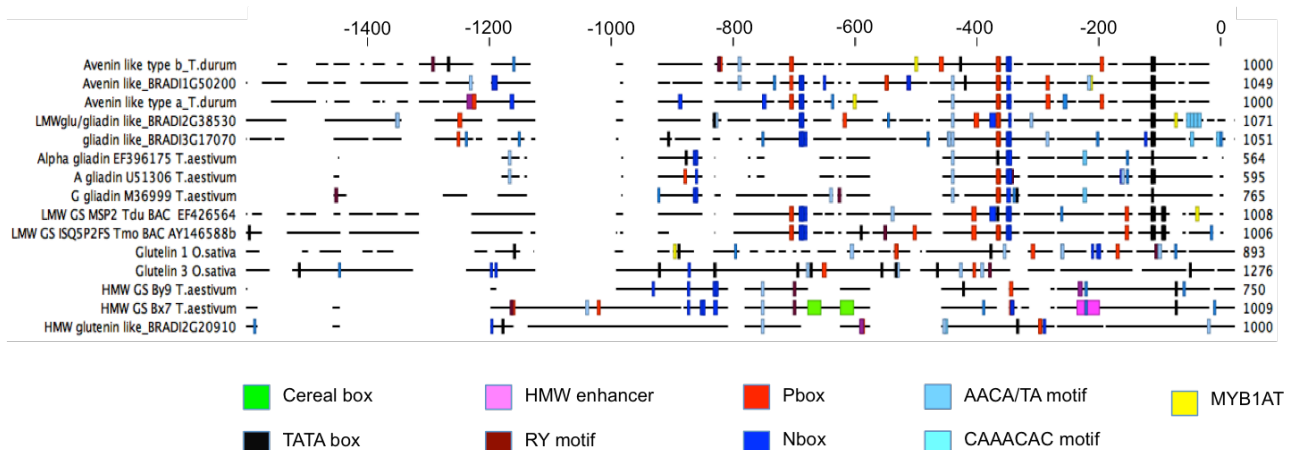
A *Brachypodium distachyon* prolamin jellegű és nem prolamin jellegű tartalékfehérjék részletes elemzésével és a búza allergiában illetve esetlegesen a cöliákiában betöltött szerepük jellemzésével az alábbi megjelent illetve bírálat alatt álló publikációink foglalkoznak:

Juhász A, Gell Gy, Sebastyén, E, Haraszi R, Tamás L, Balász E (2012) *Brachypodium distachyon* as a model for defining the allergen potential of non-prolamin proteins. *Functional and Integrative Genomics*, 12(3):439-446.

Gell Gy, Kovács K, Veres G, Korponay-Szabó I, Juhász A (2016) Characterization of globulin storage proteins of a low prolamin cereal species in relation to celiac disease. *Scientific Reports under review*

Juhász A, Haraszi R, Maulis Cs (2015) ProPepper: a curated database for identification and analysis of peptide and immune-responsive epitope composition of cereal grain protein families. Database: The Journal of Biological Databases and Curation Database (2015) 2015 : bav100, doi: 10.1093/database/bav100

A búza és rokonsági körére összegyűjtöttük az elérhető promotor információval rendelkező tartalékfehérje genomi szekvenciákat és a promoterek profilját a PLACE és PlantCare adatbázisokban megtalálható promoter motívumok alapján elemeztük. Búza gének promotereinek részletes vizsgálatával azonosítottuk a prolaminok szövetspecifikus expressziójában szerepet játszó promoter motívum variánsokat. Az előforduló promoter motívumokat a búza prolamin típusokat jól leíró kénben gazdag LMW glutenin alegységfehérje illetve a tőlük jelentősen eltérő HMW glutenin alegységfehérje gének esetében átfogóan vizsgáltuk a búza rokonsági körébe tartozó fajokban. Az így létrehozott promoter motívum lista segítségével a csoport egyik tagja, Makai Szabolcs által fejlesztett Promoter Profiler eszközt használva elemeztük a *Brachypodium* tartalékfehérje gének promoter elemeinek mintázatát is. Ezek jelenléte és eloszlása csak részleges hasonlóságot mutatott a búza prolaminokra jellemző promoter motívumokkal, így például a prolamin típusú gének promotereire általánosan jellemző -300-as elemmel. A -300-as elem, mely egy nitrogén ellátottságra érzékenyen reagáló bZIP és egy DOF kötőhely párból áll, konzerváltan megtalálható a prolamin géncsalád promotereiben. A vizsgált *Brachypodium* promoterek közül a gliadin, az LMW-glutenin jellegű gének illetve az avenin jellegű gének promoterei tartalmazzák, míg a HMW glutenin gének promoterei a búzához hasonlóan nem (1.1.3. ábra). Ugyanakkor a HMW glutenin jellegű gén promotere az ismert búza promoterektől teljesen eltérő, így például nem tartalmazta a HMW glutenin génekre jellemző Cereal boxot, illetve enhancer elemet sem.



1. 1.3. ábra Prolamin és globulin jellegű gének promotereire jellemző TF kötő motívumok

Búza homológokkal összevetve vizsgáltuk a transzkripció faktorokat is. A Plant Transcription Factor Database és magspecifikus *Brachypodium* EST könyvtár segítségével azonosítottuk a magban expresszálódó DOF, MYB és bZIP transzkripció faktorok szekvenciáit. Az irodalmi ismeretek alapján a prolamin jellegű tartalékfehérjék expressziójának szabályozásában kiemelt szerepet játszó TF-k közül kiválasztottunk 2 DOF és egy SPA bZIP típusú transzkripció faktort és azokat vizsgáltuk részletesebben a normál valamint hő illetve szárazságstressz körülmények között végzett expresszióelemzések során.

1.2 Prolamin jellegű gének expressziójának vizsgálata normál és hő illetve szárazságstressz körülmények között

Növénynevelés

A vizsgálati *Brachypodium distachyon* BD21 genotípusú növényeket SANYO fitotron kamrában neveltük tőzeges virágföld (NPK 15-9-11) és homok 2:1 arányú keverékébe ültetve, 3 hetes vernalizáció után, 15 óra, 22°C, 200 µE fény – 9 óra 18°C sötét megvilágítási periódussal, 70%-os páratartalom mellett, napi öntözéssel. A hőstressz kezelést a virágzást követő 9-11. nap közt végeztük, hasonlóan a fenti beállításokhoz, de 20 óra 28°C – 4 óra 37°C hőmérsékleti programmal.

Szárazságstressz kezelésekhöz a növényeket az előbbiekhöz hasonló körülmények között neveltük virágzásig, majd a kezelést a virágzás kezdetétől a 8 napon keresztül, vízmegvonással, a talaj nedvességtartalmának 30%-ra történő visszaeséséig végeztük, végül a növényeket visszaöntözés mellett teljes érésgig neveltük.

Mintavétel, nagy tisztaságú RNS és a cDNS minták előállítása

Az elvégzett előkísérletek során kiderült, hogy a hőstressz kísérletekhez tervezett mintavételi időrend nem illeszkedik a *Brachypodium* szemfejlődés fiziológiájához, ezért a következőképpen módosítottuk a mintavételi időpontokat: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 28, 35 DPA.

A tartalékfehérje gének expresszióját irányító transzkripció faktorok vizsgálatához a mintavételezés kezdete a kalász megjelenésének időpontja volt, majd a virágzást követő 12. napig háromnaponta vettünk mintát (-10, -6, -3, 0, 3, 6, 9, 12 DPA). A transzkripció faktorok transzkripciójának vizsgálatakor nem végeztünk stressz kezelést.

A szárazságstressz kísérletsorozathoz 0, 3, 7, 14, 21 DPA fejlettségű mintákból gyűjtöttünk kalázmintákat.

A szárazságstressz kísérletsorozatban nevelt kalászkok egy részéből nagy tisztaságú totál RNS kivonást követően RNAseq elemzéseket végeztünk, illetve a kalászkok másik részéből a kvantitatív PCR kísérletekhez mRNS-t izoláltunk az alábbiak szerint.

A szöveteket N₂ jelenlétében, steril kvarchomokkal segítségével tártuk fel. Az RNS kinyerést, ill. az mRNS tisztítást 100 mg növény anyagból végeztük GenoVision mRNA Isolation Kit-tel, 20 µl eluálási térfogattal. A kinyert mRNS teljes mennyiségét oligo-dT módszerrel cDNS-sé írtuk át. Ehhez RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) kitet használtunk. Az esetleg jelen lévő, itt szennyező DNS molekulákat DNaseI Amplification Grade (Sigma) enzimmel távolítottuk el. Az RNS molekulák emésztését RiboLock RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával gátoltuk. A kész cDNS mintákat -80°C-on tároltuk. A qPCR elemzésekhez minden esetben friss hígításokat végeztünk.

A cDNS minták ellenőrzése a kvantitatív real-time PCR-t megelőzően

A kinyert cDNS minták épségét a kvantitatív analízis előtt hagyományos PCR-rel ellenőriztük, és csak a megfelelő minőségűnek ítélt mintákat (10x hígított cDNS templáton minden referenciagénre erős pozitív PCR terméket kaptunk) vontuk be a kvantitatív elemzésekbe.

A minták mellett az egyes PCR reakciókat is optimalizáltuk. A vizsgált gének 3' végére terveztünk primereket. Génenként több primerpárt teszteltünk szemi-quantitatív PCR-rel, hogy beállítsuk a megfelelő kapcsolási hőmérsékletet, Mg²⁺ és primer koncentrációt. A szemi-quantitatív PCR alapján ígéretesnek tartott primerpárokkal 7-tagú hígítási sorból hatékonyságbecslő real-time PCR-eket végeztünk. Minden esetben legmagasabb reakcióhatékonyságot eredményező primerpárral és reakciókörülményekkel végeztük a minták kvantitatív analízisét. Amennyiben a hatékonyság nem érte el a 85%-ot új primerpárt terveztünk az analízishez. A cDNS mintákat a vizsgálat során 50x és 200x hígításban használtuk. A megfelelő hígítást úgy választottuk, hogy a kapott Ct értékek az összes vizsgált gén cDNS-ére nézve a reakciók dinamikus tartományában maradjanak.

A hagyományos PCR reakciókhoz rekombináns Taq DNA Polymerase enzimet (Thermo Fisher Scientific), a real-time reakciókhoz Luminaris Color HiGreen/high ROX qPCR Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A méréseket StepOne™ Plus Real-Time készüléken (Applied Biosystems) végeztük a hozzá tartozó StepOne™ v.2.2.2 szoftverrel. Az Excel file-ban exportált Ct adatokat manuálisan értékeltük.

A primereket a Microsynth cégtől rendeltük, összesen 72 szekvenciát terveztünk és rendeltünk, melyek alkalmasak a tartalékfehérje, a Transzkripció Faktor és a referencia gének vizsgálatára.

Kvantitatív real-time PCR elemzésbe bevont gének

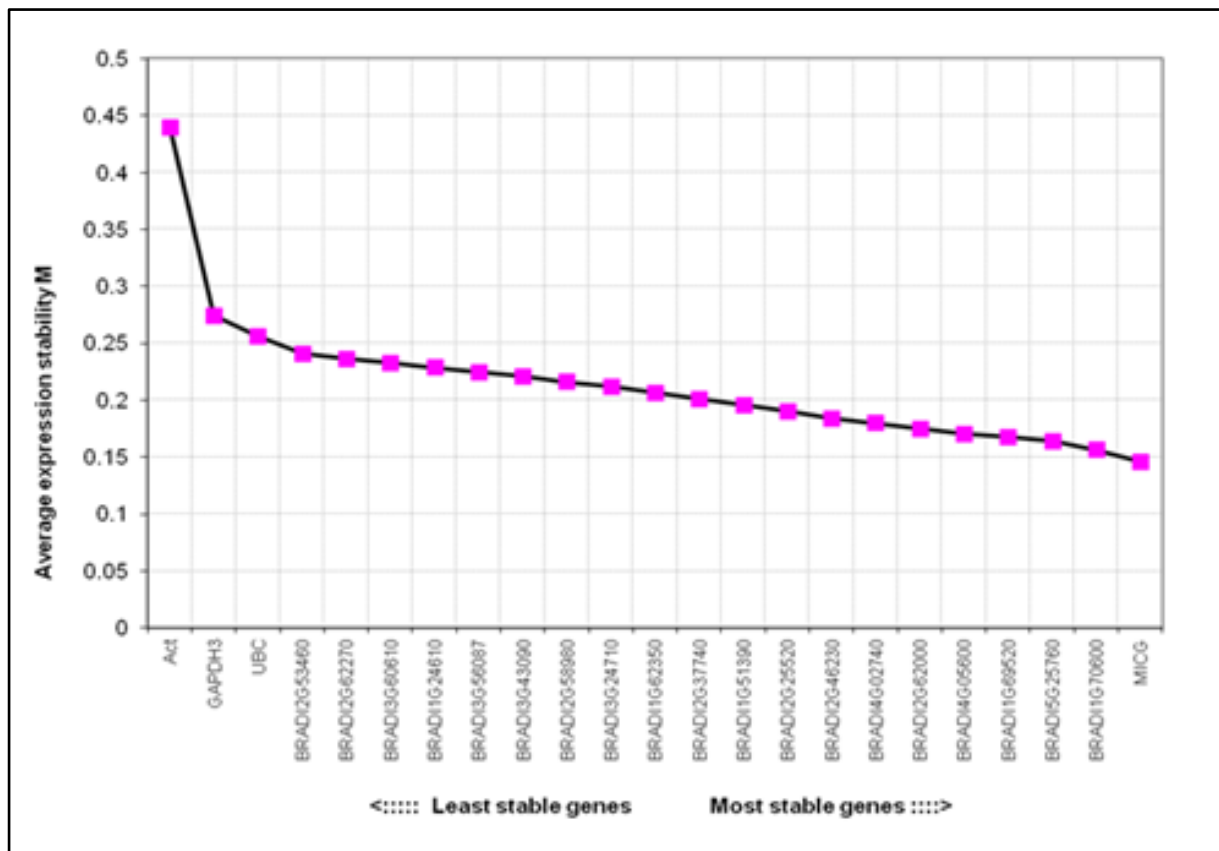
Eredetileg öt tartalékfehérje gént terveztünk vizsgálni (1. Táblázat).

1. Táblázat A vizsgálatba vont *Brachypodium distachyon* tartalékfehérje gének

BRADI1G50200	Storage protein precursor	avenin-like
BRADI2G38530	Prolamin precursor	LMW-glu/gliadin-like
BRADI2G20910	Prolamin precursor	HMW glutenin-like
BRADI3G17070	Prolamin	Gamma gliadin-like
BRADI2G39940	Prolamin	Alpha gliadin-like

Az első mérések során kapott nagy szórás értékek miatt azonban nem csak a növényi mintavételezésen szigorítottunk, hanem további két referenciagént is bevontunk a vizsgálatokba (ACT7 = BRADI3G30710, GAPDH = BRADI3G14120), melyeket egy korábban megjelent publikáció alapján választottunk ki (Hong et

al., Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR *BMC Plant Biology* 2008, 8:112). A referenciagének validálása során kiderült, hogy az *act7* gén nem elég stabil, így nem használható. Ezt később az RNAseq vizsgálatok is megerősítették (1. Ábra).



1.2.1. Ábra A referencia gének stabilitása RNAseq vizsgálatok adataiból kalkulálva.

Az adatokat geNorm és NormFinder szoftverek felhasználásával elemeztük.

Korábbi *in silico* vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy három Transzkripciós Faktor (TF) hatása nagyon erős lehet az endospermium tartalékfehérjéinek expressziójára abiotikus, környezeti stressz során. A hipotézisünk tanulmányozására mindhárom gén [*DOF3* (BRADI3G38980), a *DOF4* (BRADI2G10640) és a *SPA-bZIP* (Bradi1G05480)] időbeli transzkripciós profilját vizsgáltuk qPCR módszerrel.

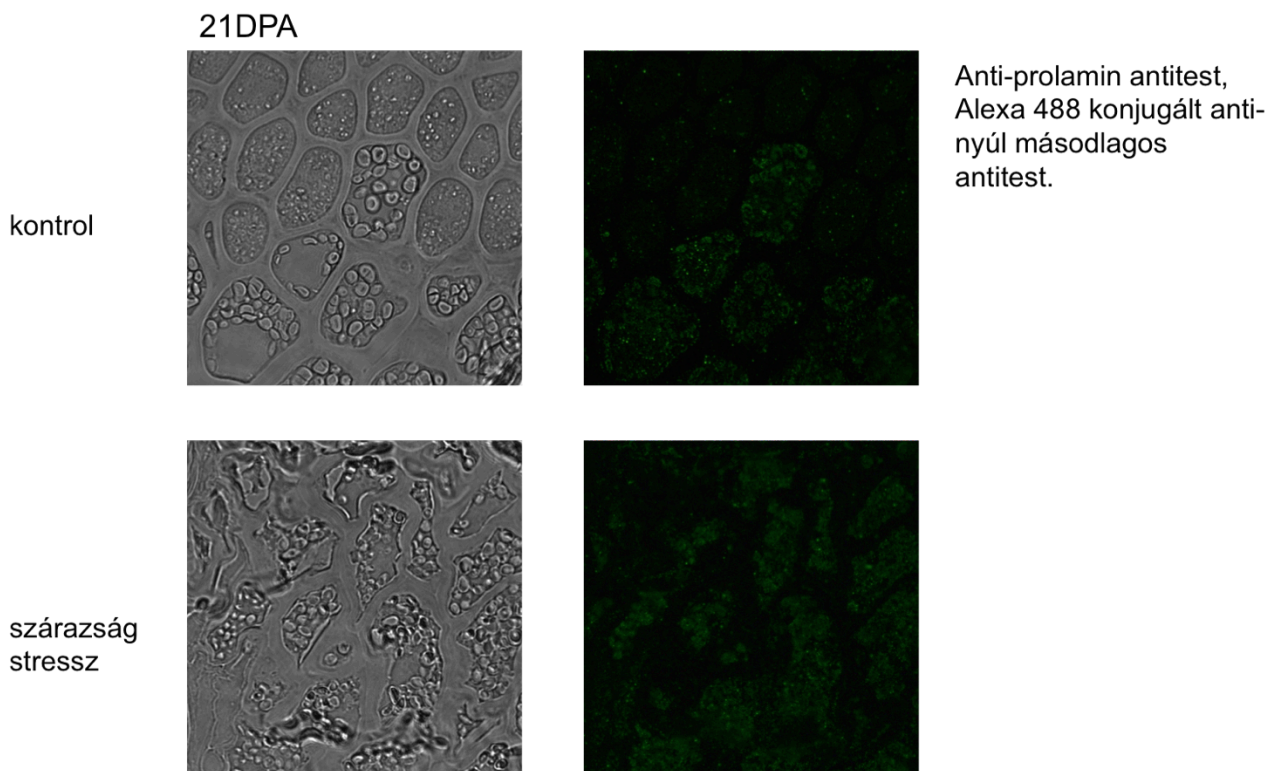
A transzkripciós faktorok vizsgálata során problémát jelentett a nagy expressziós szint különbség a vizsgált gének és a referencia gének közt, ami csökkentheti a mennyiségi meghatározás pontosságát. Ennek korrigálására a TF géneknek a vizsgálatokor egy újabb referencia gént kerestünk, majd használtunk is. Ehhez segítségünkre volt, az addigra elkészült teljes RNS szekvenálás adatbázisa. A NormFinder és geNorm szoftverek segítségével választottuk ki azt a legstabilabb gént, ami a transzkripciós faktorok génjeihez hasonló expressziós szintet mutatott (MICG = BRADI2G62680).

Ezt a harmadik referenciagént nem használtuk a tartalék fehérjék vizsgálatokor.

Egy további problémát is meg kellett oldani a TF gének transzkripciós profiljának vizsgálatokor. A TF gének expressziós szintje nagyon alacsony, különösen a kalászolás kezdetekor. Ez azt jelenti, hogy az mRNS szintje nagyon alacsony, ezért a cDNS koncentrációja is. Ebben az esetben a qPCR-hez általában alkalmazott 50-szeres hígítást nem tudtuk alkalmazni, ellenben a hígítatlan minta esetében nem kaptunk megfelelő, stabil, megbízható Ct értékeket. Hogy hígítás nélkül is használható legyen a preparált cDNS, egy tisztítási lépésre volt szükségünk. Néhány tisztító kivet kipróbálva a ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research) kit

bizonyult a legjobbnak a mi kísérleti körülményeink között. A tisztított cDNS mintákon végzett qPCR eredmények megbízhatóak voltak.

A tartalékfehérjék akkumulációját immunomikroszkópiás módszerrel is követtük. Ezekhez a vizsgálatokhoz 14 és 21 napos kontrol és szárazságstressznek kitett növényekből származó endospermium mintákból metszetet készítettünk, majd beágyazást követően prolamin specifikus antitesttel detektáltuk a prolamint. A detektáláshoz Alexa 488 festékkel konjugált anti-nyúl másodlagos antitestet használtunk. Ez a kísérlet illetve részletes kiértékelése még folyamatban van. Az eddig elkészült adatok alapján egyértelműen látszik, hogy 21 DPA állapotban az endospermium sejtek szerkezete abnormálisan megváltozott, illetve a fehérje testek intenzívebben festődnek (1.2.2. ábra).



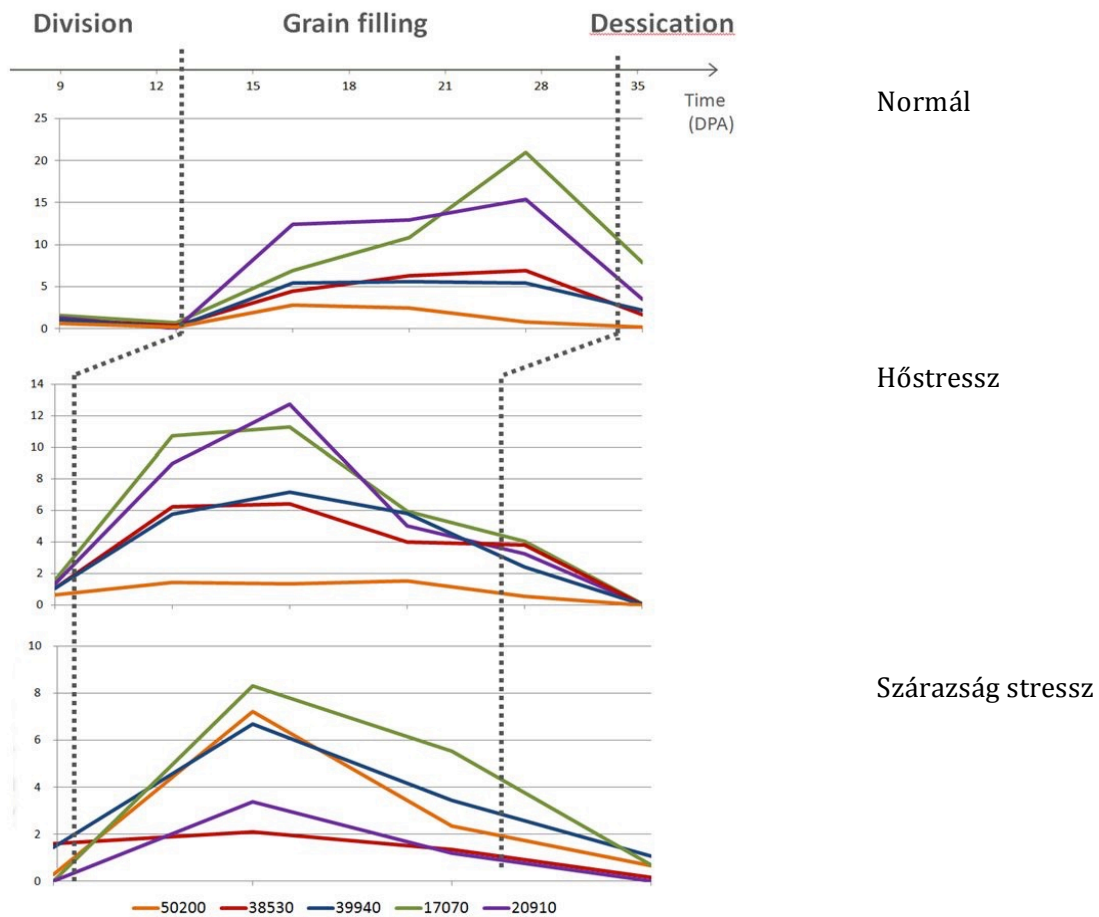
1.2.2. ábra Immunofluoreszcens jelölt Brachypodium endospermium szövet kontrol és vízmegvonásos stresszkezelés mellett.

q-RT PCR assay eredményei

A teljes projekt során mért összes Ct értéket egy nagy Excel file tartalmazza (2. Táblázat). Több száz, különböző időpontban vett kontroll, vagy stressz kezelt Brachypodium növényből származó minta adatait tartalmazza. Legalább háromszor ismételtük meg a növénynevelést kontroll és stressz körülmények között. Ezekből a növényekből mRNS tisztítottunk, amit átírtunk cDNS-be és kvantitatív real-time PCR módszerrel meghatároztuk a mintákban a különböző génekre vonatkozó mRNS szintet a virágzást követő, ill. az azt megelőző különböző napokon. A qPCR eredmények kiértékeléséhez Pfaffl módszerét alkalmaztuk, vagyis a relatív mennyiségek (NRQ) számításakor az előzetesen becsült reakcióhatékonyságokkal korrigáltunk. A normalizációt 2 (tartalékfehérje gének) ill. 3 (transzkripció faktor gének) esetében referenciagén együttes figyelembevételével (normalizációs faktor) végeztük.

Következtetések

A tartalékfehérjék expressziójának időbeli lefutása hasonló a búzában megismertekéhez. A osztódási fázisban még nem jelentős a tartalékfehérje gének expressziója. Az mRNS szint a virágzást követő 15. napon kezd emelkedni, csúcsa 21 és 28 nap közt van, de a 30-35. nap után az expresszió szintje újra leesik.



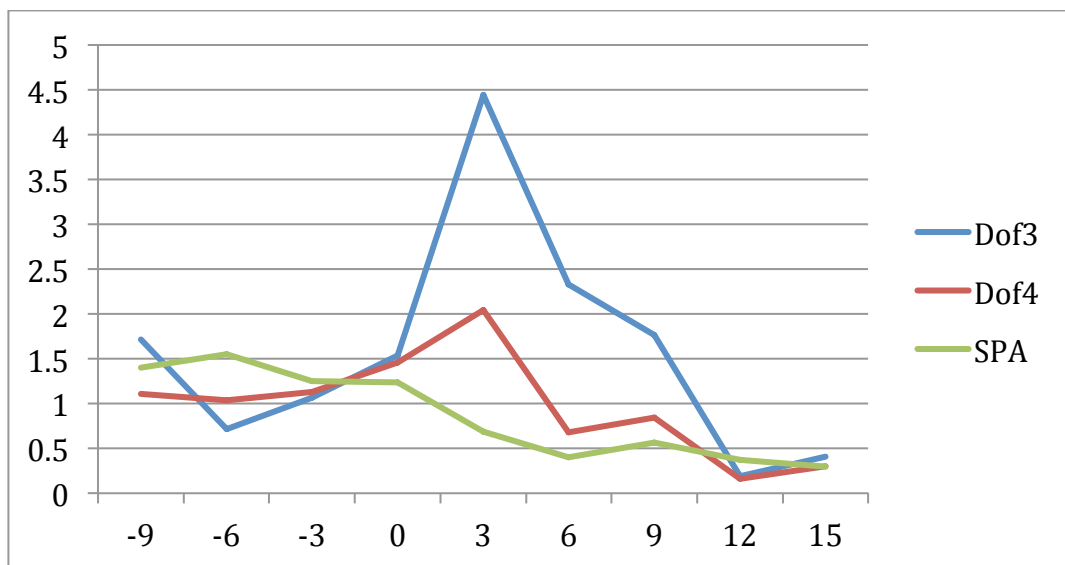
1.2.3. Ábra Az expressziós szintek változása és időbeli eltolódása hő és szárazságstressz hatására 5 tartalékfehérje génjének esetében. Bradi3g17070 – gamma gliadin-like , BRADI1G50200 – avenin-like, BRADI2G38530 – LMW glutenin/gliadin-like, BRADI2G20910 – HMW glutenin-like, BRADI2G39940 – alpha gliadin-like

A legmagasabb expressziós értéket a HMW glutenin-like (BRADI2G20910) és a gliadin jellegű (BRADI3G17070) tartalékfehérje gének mutatták. Stressz hatására ennek a két génnek az aktivitása csökkent. A másik három prolamin gén esetében a stressz hatására emelkedett a génexpresszió szintje (1.2.3. ábra).

Az expressziós értékek változásánál azonban sokkal markánsabb különbséget okozott a stressz kezelés a gének időbeli lefutásában és az expressziós görbék alakjában, a maximális expressziós szintek elérésében. Az alkalmazott hő illetve szárazságstressz hatására a gének expressziós csúcsa jelentősen korábbra tolódott, a virágzást követő 12-18 napok közé tehető mind az öt gén esetében. A virágzást követő 21 napnál már erőteljesen lecsengőben van az expressziós szint, míg a 35. napra a kiindulási érték alá csökkent. Az egyes gének görbéjének alakjába is eltérést tapasztaltunk. A gliadin jellegű Bradi3g17070-es gén (az ábrán zöld színnel jelölve) esetében normál körülmények között az expresszió a szemtelítődés viszonylag kései

szakaszában, a 28DPA körüli fejlettségi szinten éri el maximumát, ez a maximum a stressz körülmények között 10-14 nappal korábbra tehető. A génből szintetizálódó fehérje konzervált cisztein domainje és aminosav szekvenciája alapján a búza kénben gazdag gamma gliadinjaihoz hasonlít leginkább. Ugyancsak figyelemreméltó eredmény az egyik avenin-jellegű gén (BRADI1G50200) expressziójában bekövetkező változás, mely különösen a szárazságstressz kezelés esetén volt szembetűnő. A normál és hőstressz körülmények között alacsony szinten expresszálódó gén szárazságstressz hatására szignifikánsan nagyobb mennyiségben szintetizálódott.

A vizsgált DOF és SPA bZIP transzkripciós faktorok expressziószintjében normál körülmények között a szemfejlődés legkorábbi szakaszaiban tapasztaltunk szignifikáns változást (1.2.4. ábra). A vizsgált transzkripciós faktorok expressziós profiljának részletes elemzése stressz körülmények között folyamatban van.



1.2.4. ábra A vizsgált transzkripciós faktorok expressziószintjeinek változása a szemfejlődés korai illetve az azt megelőző szakaszaiban.

A kapott eredmények alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az élettani folyamatok felgyorsultak a magas hőmérséklet okozta stressz, illetve az alacsony talajnedvesség hatására bekövetkező szárazságstressz eredményeként. Ez kifejeződik a szemtermésben felgyorsuló folyamatokban is, mint például a tartalékfehérjék expressziójának korábbi indulásában és gyorsabb lefutásában, illetve az egyes tartalékfehérje típusok expressziószintjében bekövetkező jelentős eltérésekben is. Ezek az eredmények összhangban állnak a búza tartalékfehérje profilokban tapasztalt változásokkal. Az egyes fehérje típusok közötti expresszió dinamikában jelentkező eltérések, a vizsgált transzkripciós faktorok mennyiségének részletes elemzése és az ezek mögött rejlő (esetleges) szabályozási folyamatok feltárása a szárazságstressz kísérletek során végzett RNAseq adatok kiértékelésével kiegészítve folyamatban van. Előzetes elképzelésünk szerint az egyes fehérjecsoportok termeődési dinamikájában bekövetkező változások összefüggésben állhatnak az adott fehérje családokra átlagosan jellemző N és S tartalmú aminosavak mennyiségével.

Publikációk

Nemzetközi Konferencia poszter:

- Characterising the wheat prolamin homolog genes in the model monocot plant *Brachypodium distachyon*. 17th European Congress of Biotechnology 2016, Krakow, Poland In: New Biotechnology (2016) 33:S166-S167

Készülő kézirat:

Effect of heat and drought stress on storage accumulation in the model plant *Brachypodium distachyon*. Plos One

1.3 *Brachypodium* tartalékfehérjék expressziójának komplex hálózatelemzése normál és szárazságstresszelt körülmények között RNAseq elemzések alapján

A stabilan expresszáldó gének alapján meghatározott genetikai kronológiája a fejlődő endospermium szövetnek.

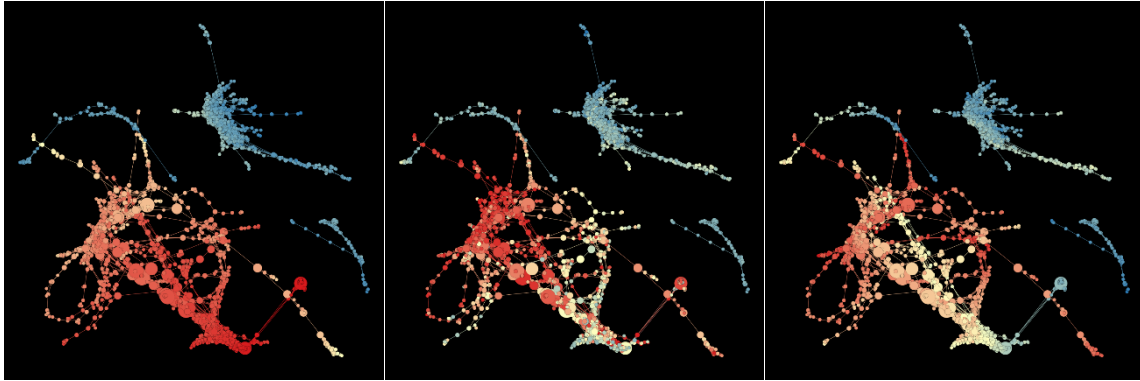
Az RNAseq elemzésekből kapott expressziós adatok, valamint a genom szekvencia adatok alapján rendelkezésre álló promoter profilok alapján vizsgáltuk az azonos stádiumban stabilan együtt expresszáldó, ún ko-expressziós génhálózatok összetételét. A ko-expresszió hálózat szerkesztéséhez a normalizált expresszióértékek adatsorankénti Pearson korrelációs koefficiensét (PCC) használtuk. A hálózat megjelenítése és elemzése a Gephi nevű programmal történt (Bastian és mtsai., 2009). A hálózat a $PCC > 0,9$ szűrése esetén is rendkívül kusza volt, és az általunk keresett génhálózatok vizuális megjelenítése a hálózat összetettsége miatt lehetetlen volt, így a vizsgált gének génprogramjaira fókuszáltunk. A vizsgált gének promoter motívumait elemezve kiszámoltuk, hogy a HMW glutenin gének promoterein mennyire szignifikáns két TF kötőhely (duplex) együttállása. Tekintve, hogy a konzervált együttállás nagy eséllyel kölcsönhatást is feltételez, ezen p értékeket használtuk fel, hogy a hálózat hasonló két TF-a közötti éleinek súlyát (PCC) módosítsuk az alábbi képlet szerint:

$$FN_i^{ab} = \log_{10} \left(\frac{PCC_i}{p_{ab}} \right)$$

Ahol az FN a fókuszált hálózat súlya; az ab jelölő az i -dik él egyik (a) és másik (b) csomópontjának TF-a; a PCC a Pearson-féle korrelációs koefficiens és p az adott két TF kötő motívum együttállásának a p értéke (szignifikanciája). A fókuszálást aztán egy $FN > 0$ szűréssel értük el. Ez az eljárás lényegében kiemelte a meglévő erős ko-expressziót azok között a TF-ok között, amelyek kötőhelyei a vizsgált gének promoterein szignifikáns duplexet képeztek. Az alhálózatokat a Blondel és munkatársai által közölt algoritmussal határoztuk meg (Blondel és mtsai., 2008). A ko-expressziós elemzés alapján lehetőségünk volt azon gének és géncsaládok meghatározására, melyek expressziója a végzett stressz kezelésektől független. Ezen gének feltehetően a szövet fejlődésének alapvető genetikai programját képviselik, illetve a környezeti hatásokra kevésbé reagálnak.

A kapott stabil ko-expressziós hálózat egy skálafüggetlen hálózat, amely szűrés után 6626 csomóponttal és 34045 éllel rendelkezett. A hálózat modularitása 0.835, és 13 olyan modul adódott, amely 50-nél több gént foglalt magába. A modulok funkcionális vizsgálatára GO címkék feldúsultságát elemeztük. A fejlődést 4 fázisban vizsgáltuk.

Első Fázis



1.3.1. ábra Stabilan expresszálódó gének hálózata a virágzást követő 0-3, 7 és 14DPA állapotban . A színek az expresszió erősségét jelölik (piros magas, kék alacsony).

Az első fázisban található modulok a virágzás követő 0. és 3. napon érték el az aktivitásuk csúcsát (1.3.1. ábra) Ezek között olyan géneket találtunk, amelyek az auxin poláris transzportjárt felelnek, pektin metabolizmusban vesznek részt, a sejtfal módosítását végzik, és plamodezmatán keresztül történő intercelluláris transzportban játszanak szerepet. A szabályozási aspektusa is szépen kirajzolódott ennek a korai fázisnak: auxinválaszban és szervnövekedésben résztvevő gének túlsúlyban vannak. Már a virágzást követő harmadik napig megjelenik egy gén, amely a szinktium formálódásában vesz részt. Ugyanekkor a kalcium mediált jelátvitelnek nagy szerepe van a szinktium formálódásában. Centrolaterális tengely kialakulása is ekkor figyelhető meg a génexpressziós adatok szerint, amely tökéletesen összevág az élettani ismereteinkkel.

Sajnos elkerülhetetlenül szennyeződött a minta zöld szövetrel, mert 0. és 3 napon az endospermium nem illetve nehezen izolálható. A fotoszintézishez kapcsolt gének ugyanakkor külön modulba rendeződtek, így azok leválaszthatóak az endospermium fejlődési moduljairól. Nem lenne így, ha a további minták is szennyeződtek volna zöld szövetrel.

Második fázis

A 3. naptól a 7 napig tartó szakaszban a GO címkék alapján a sejtek proliferációja, a sejtosztódás negatív szabályozása, szövetfejlődés és DNS alapú transzkripciós szabályozása a főszerep. Mindez összhangban van az endospermium fejlődés korábban ismert szakaszaival. A jelátviteli oldalon szerin és cisztein típusú endopeptidázok túlsúlyba kerülnek.

Harmadik fázis

Ebben a fázisban a teljes transzkriptóm elemzés a 8. és 14. nap közötti szakasz genetikai eseményeiről tudósít, amely búza esetében a szemtelítődési fázisnak felel meg. A genetikai modulok topológiailag egyértelműen elkülönülnek az ezt megelőző és ezt követő moduloktól. A modulok funkcióit tekintve feltűnő gibberellinsavhoz kötött jelátvitel, fehérje desumoylation, egyirányú sejt növekedés, hipoxia detekció, tartalékképző aktivitás és szalicilsav bioszintézis.

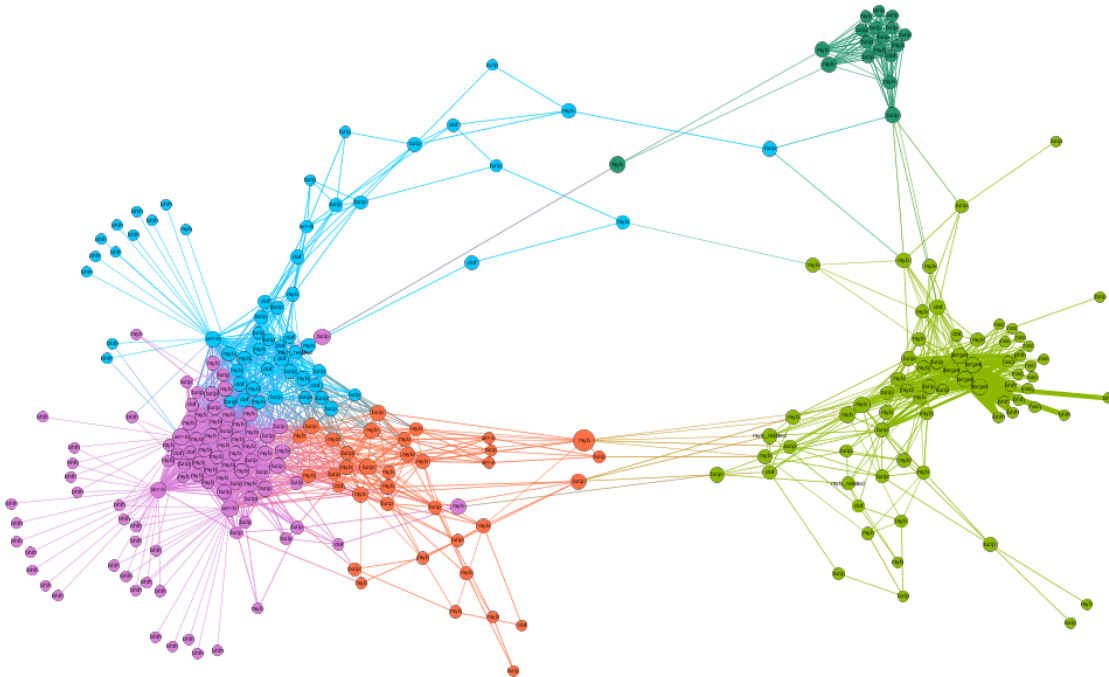
Negyedik fázis

Az utolsó vizsgált fázis a virágzást követő 15. és 21. nap közötti szakaszt reprezentálja. Vizsgálódásaink nyomán több jól elkülönülő modult azonosítottunk, amit most nem tárgyalunk külön. A funkciókat tekintve erre a szakaszra jellemző folyamatok a lipid raktározás, hideg aklimáció, hiszton-kináz, RNS feldolgozás, fehérje tekeredés (folding), illetve abszcizinsav válasz, víz depriváció válasz, almasav szintézis és szerin endopeptidáz aktivitás . Ez utóbbi funkció csokor nagyon hasonlít a sztóma zárósejtjeinél leírt jelátvitelhez, illetve a klasszikus ABA kötött ozmotikus jelátvitelhez. Tekintve, hogy az endospermium nem csak hipoxiás szövet, de magas benne az ozmotikumok koncentrációja is, nem kizárt hogy itt egy szabályozási útvonal „újrachasznosításának” vagyunk a szemtanúi, ami ezúttal a tápanyag raktározást szolgálja.

További modulok ebben a szakaszban olyan géneket tartalmaznak, amelyek funkciója magi lipid testecske biogenezis, lipid raktározás, peroxidoxin, illetve proton-transzport a vakuólumban, ER és Golgi, valamint nukleotid kötődés, amely a géncsendesítés szerepét erősíti.

Tartalékfehérjék fókuszált hálózata

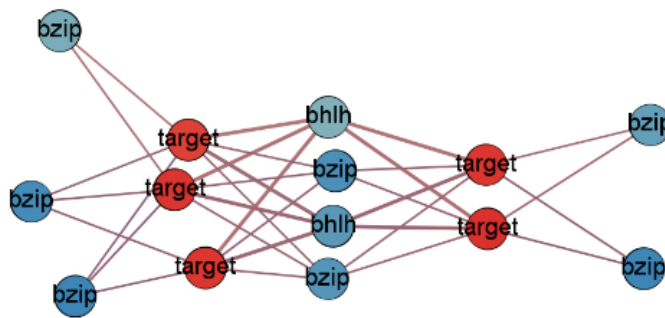
Elkészítettük az azonosított globulin és prolamin típusú tartalékfehérjék fókuszált ko-expressziós hálózatát (1.3.2. ábra).



1.3.2. ábra Fókuszált ko-expressziós hálózat. A színek az azonos fejlődési fázisban expresszáló tartalékfehérjéket illetve transzkripciós faktorokat kódoló géneket tartalmazó modulokat jelölik.

Korábbi vizsgálatainkat megerősítve első megállapításunk az volt, hogy a vizsgált gének promoter profilja csak részben hasonlít a búza hasonló génjeinek promoterére. Feltűnően nagy szerepet kapnak a *Brachypodium* magfejlődésben a bHLH típusú transzkripciós faktorok. A munkánk során törekedtünk a búza esetében ismert TF-ok ortológjainak meghatározására. Ezt azonban nem tudtuk kellően meggyőzően kivitelezni. Kapcsolati hálózataik alapján sem PBF-DOF, sem SPA-bZIP sem GaMYB ortológokat nem sikerült kellő bizonyossággal beazonosítanunk, habár konkrét jelöltjeink vannak. A tapasztalt szekvenciabeli eltérés azonban olyan mértékű, ami nem tette lehetővé az ortológ gének azonosítását. Az eredmények részletes elemzése folyamatban van. Eddigi vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a *Brachypodium distachyon* szemtermése, noha tartalmaz gliadin és glutenin jellegű géneket, ezek transzkripciós szabályozási mechanizmusai jelentősen eltérnek a búza prolamin gének expressziós szabályozási mechanizmusaitól, így előzetes várakozásainkkal ellentétben a *Brachypodium distachyon* nem használható fel a búza szemtermés modellezésére mindenféle kritika nélkül.

Annyi hasonlóság azonban mégis van, hogy a tartalék képzésben a *Brachypodium*ban is jelentős szerep jut a negatív szabályozásnak, ami annyit jelent, hogy a szóban forgó gének a legtöbb szövetben gátolva vannak, s csak az endospermium képes feloldani ezt a gátlást. Itt különösen nagy szerep jut azonban a bHLH és bZIP transzkripciós faktoroknak (1.3.3. ábra).



1.3.3. ábra Negatív fókuszált hálózat. Target jeöli a vizsgált tartalékfehérjét. Csak az ego-hálózat van feltüntetve.

A vizsgált tartalékfehérjék kivétel nélkül a 3. fázisban mutatták a legnagyobb aktivitást.

Szárazságstressz hatása a fejlődő endospermiumban

Érdekes tapasztalat, hogy az alkalmazott szárazságstressz legszembetűnőbb hatása a transzkriptómra az, hogy felgyorsította a genetikai programok ütemét. A gének egy jelentős részénél az expresszió korábbi indulását tapasztaltuk a stressz körülmények között. Mindez a jelenség egy új kiértékelési algoritmus kidolgozását tette szükségessé, ahol a korrelációt az úgynevezett eltolódás vektorok alapján számoljuk. Ez a kiértékelés sajnos még tart. Ugyanakkor az említett tény már önmagában is megerősíti azt a fentebb is említett hipotézist miszerint a fejlődését meghatározó egyik fontos szabályozási kör eleve a szárazság/ozmotikus stressz szabályozási körére épül. Hasonlóság adódik az élettan alapján is. Mindkét esetben a keményítőszintézis, a cukor jelátvitel és a szerinpeptidázok fontos szerepet töltenek be, nem beszélve az ABA függő jelátvitelről.

Jelentősebb publikációk:

Az elemzési módszereket Makai Szabolcs fejlesztette, ezek fókuszált génexpressziós hálózatokra adaptált verzióját PhD dolgozata és az alábbi publikáció foglalja össze:

Makai Szabolcs A polimerképző glutenin alegységfehérjék szabályozási folyamatai búzában. PhD értekezés (2015)

Sz. Makai, Cs. Éva, L. Tamás, A. Juhász (2015) Multiple elements controlling the expression of wheat high molecular weight glutenin paralogs. *Functional and Integrative Genomics*, doi: 10.1007/s10142-015-0441-4

A gabonafélékben azonosított HMW glutenin jellegű gének promótereinek jelentőségéről szóló eredményeket és ezek potenciális bevonást a genom editálásba az alábbi elfogadott publikáció tartalmazza:

S. Makai, L. Tamás, A. Juhász (2016) A catalogue of regulatory sequences for trait gene for the genome editing of wheat. *Frontiers in Plant Science* doi:10.3389/fpls.2016.01504

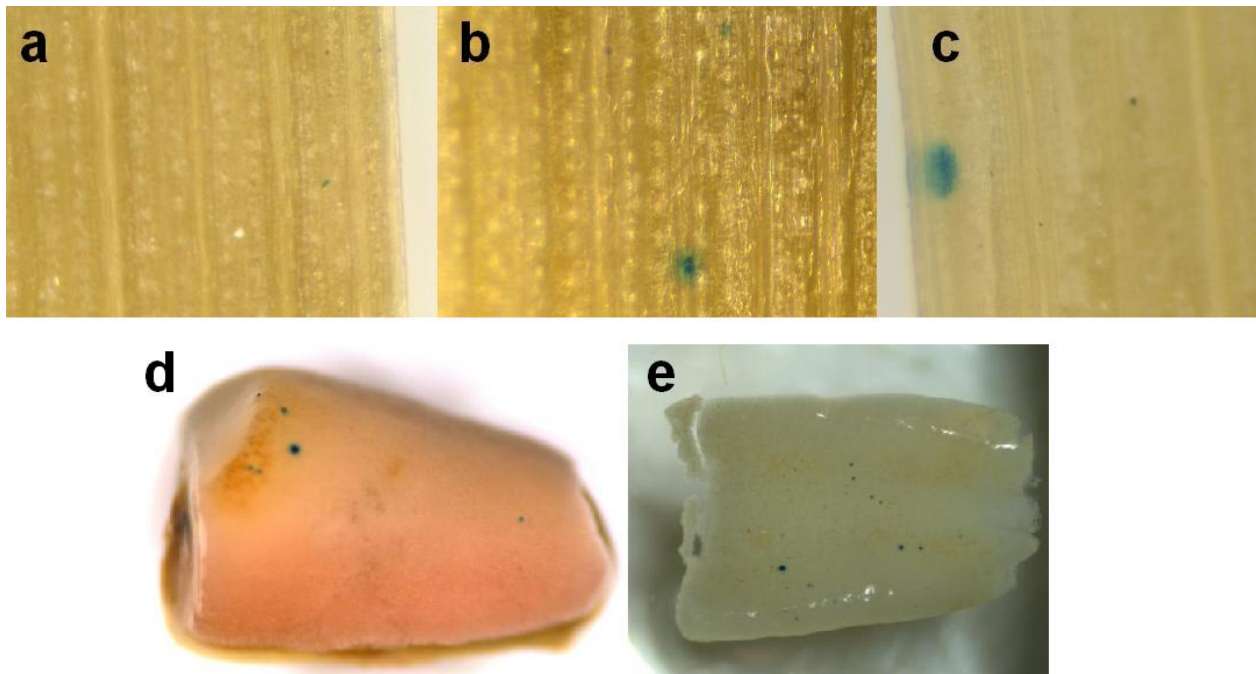
A *Brachypodium* szemfejlődésére vonatkozó RNAseq alapú expressziós vizsgálatokból készülő kézirat tervezett címe:

Genetic chronicle of developing endosperm of *Brachypodium distachyon* in normal and drought conditions.

BMC Plant Biology

1.4 Prolamin specifikus promóter elemek vizsgálata *Brachypodium* modell rendszerben és búzában

A búzára és a rokonsági körébe tartozó fajokra jellemző prolamin gének közül a HMW glutenin alegységfehérje gének promotere a legerősebb, hiszen az alacsony kópia szám (2 gén genomként) ellenére a termelt fehérje mennyisége arányaiban a legjelentősebb az összes tartalékfehérje tartalomra vonatkozóan. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a HMW gluteninek transzkripció szabályozása a kénben gazdag prolaminoktól eltérően modulárisan, feltehetően egy hajtúszerkezet kialakulásának köszönhetően, különböző transzkripció faktor komplexek kialakulása és együttműködése eredményeként történik. A bioinformatikai elemzések során előre jelzett búza HMW glutenin gén promóter-modulok funkciójának tesztelésére vad és mutáns HMW glutenin *Glu1Bx7* promótereket klónoztunk promotertesztelő vektorba, GUS riporter gént elé. A vizsgált promóterek erejét és szövetspecifitását az általuk meghajtott GUS riporter gént transziens expresszióján keresztül vizsgáltuk a célszervben, az endospermiumban, illetve a célszerven kívül, a levélben. Minden vizsgálandó fajra és szervre (Bánkúti 1201 búza levél és endospermium, illetve Bd21 *Brachypodium distachyon* levél és endospermium) sikerült működő bioliztikus transzformációs rendszert adaptálnunk (ld. **1.4.1. ábra**).

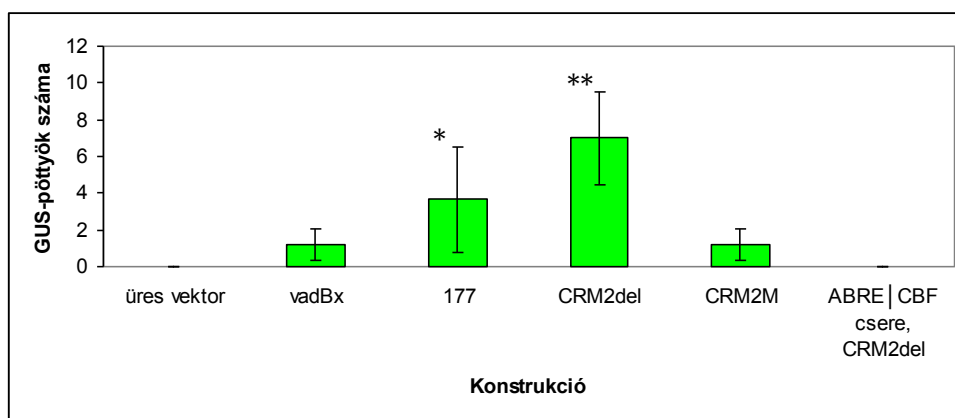


1.4.1. ábra: GUS riporter gént transziens expressziója promóter-riporter gént assay-ban. Búza (*Triticum aestivum* cv. Bánkúti 1201) leveleket bioliztikus módszerrel transzformáltunk vad típusú Bx7 (a), Bx7 promóter 177 bp hosszú kezdeti szakasza (b) és CRM2-delécióval Bx7 promóter :: GUS riporter gént konstrukcióval (c). Bánkúti búza (d) és *Brachypodium distachyon* endospermiumot (e, felnagyítva) is belőttünk vad típusú Bx7 promóter :: GUS riporter gént konstrukcióval.

Módszerünket felhasználva a következő eredményeket értük el. Búza endospermiumban a vad típusú Bx7 promóter mutatta a legnagyobb aktivitást. A promóter részét képező ABRE|CBF cluster kicserélése azonos méretű, értelmetlen szekvenciára csökkentette a promóter aktivitását, azonban nem olyan mértékben, mint az elem teljes deléciója. Búza levélben az előzőtől eltérően a promóterek erőssége a következő sorrendben változott: cserélt szakasz>vad típusú>deléció. Mindebből azt a következtetést vontuk le, hogy az ABRE|CBF clusternek szerepe lehet a szövet (endospermium) specifitás kialakításában, de a transzkripció

aktiválásában is. Eddigi eredményeinket már leközlöttük a Functional & Integrative Genomics folyóiratban, bioinformatikai elemzésünk eredményeivel együtt melyek a promóter-modulok egymással történő interakciójára utaltak (Makai és mtsai. 2015). A transzkripció starthelytől távolabb lévő modulok DNS-hajlításon keresztül „ráerősíthetnek” a transzkripcióra és ez lehet a magyarázat ezen promóterek magas aktivitására. A Brachypodium modellnövény endospermiumában a búza endospermiumával teljesen egyező eredményeket mutattak a mutáns búza Bx7 promóterek, ami utal arra, hogy a Brachypodium endospermiumában a HMW glutenin gének transzkripciójában szerepet játszó transzkripciós faktorok jelen vannak és aktivitásuk a búza HMW glutenin specifikus transzkripciós faktorokhoz hasonló.

A továbbiakban az eddig nem vizsgált HMW GS promóter-elemek szerepét kutattuk és bioinformatikai modellünk premisszáinak helytállóságát teszteltük (**ld. 1.4.1. és 1.4.2. ábra**). Az ABRE|CBF clusterhez hasonlóan a 2. cisz-regulációs-modulról (CRM2) is kiderült, hogy szerepe van a szövet (endospermium) specifitás kialakításában. A HMW GS gének promótereiről eddig nem volt ismert, hogy gátló elemeket tartalmaznak, más gabona prolamin génekről azonban tudott volt, pl. hogy vegetatív szövetekben expressziójukat a gének promótereiben lévő AACA/TA motívumhoz kötődő MYB transzkripciós faktorok gátolják (Suzuki és mtsai. 1998; Diaz és mtsai. 2002; Chen és mtsai. 2005). Mindkét említett HMW GS promóter modult (ABRE|CBF cluster és CRM2), vagyis a két levélben gátló elemet elmutáltatva viszont – érdekes módon – levélben teljesen inaktív promotert kaptunk. A magyarázat az lehet, hogy itt a promóterelemek egymással való interakcióját is sikerülhetett elrontani. A Bx7 promóter elejének igen rövid, 177 bp-os részének aktivitását is teszteltük. Még ez a kis szakasz is funkcionális promoternak bizonyult, mely egybevág a bioinformatikai elemzés eredményével. Ezen a szakaszon még nincsenek gátló elemek, így levélben aktívabb, mint a vad típusú teljes promóter. Az endospermium-transzformációs kísérletek még folyamatban vannak.

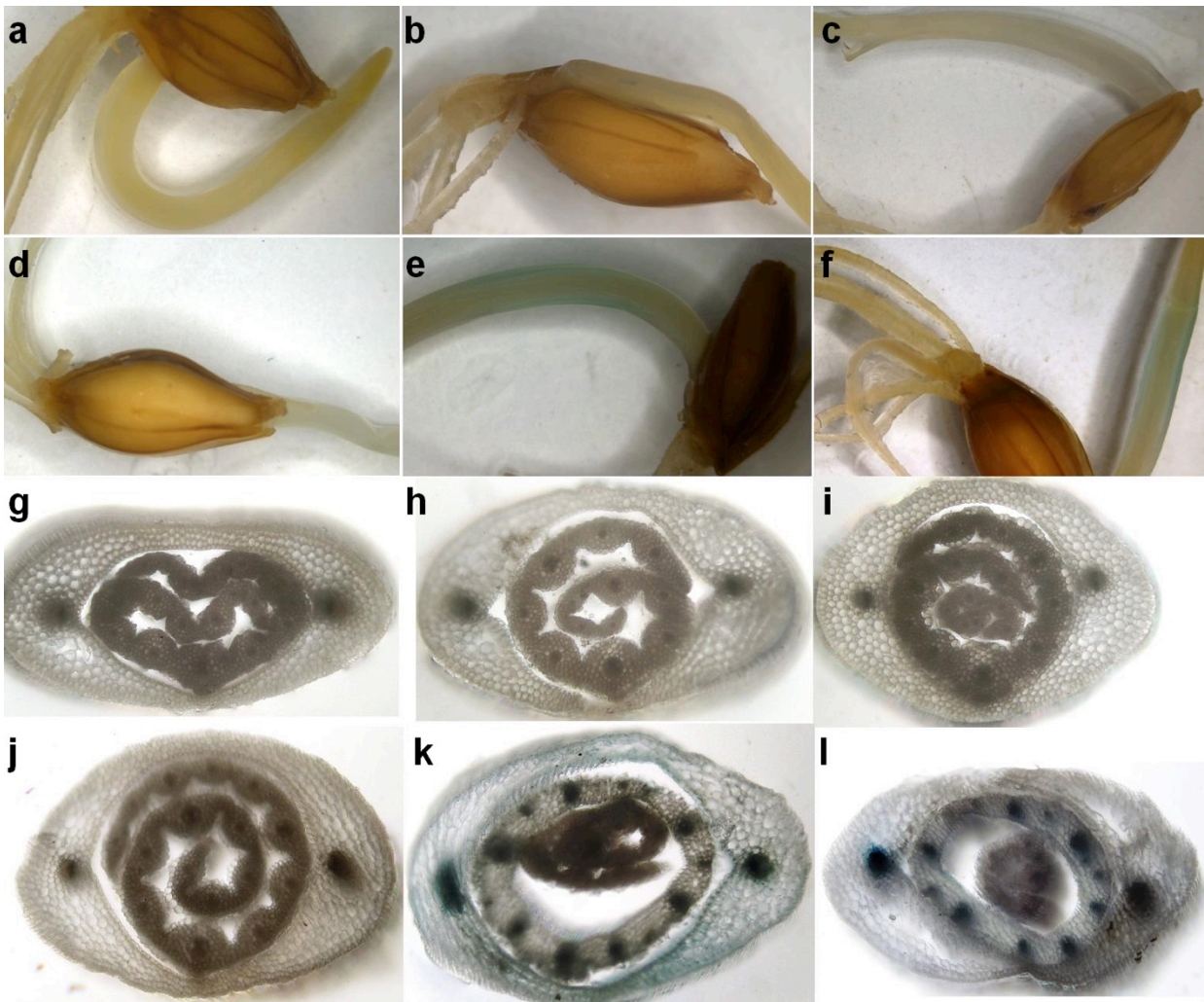


1.4.2. ábra: Vad típusú és mutáns Bx7 promóterek expressziós erőssége GUS riportergénes tranziens expresszió során. A vizsgált mutánsok: Bx7 promóter 177 bp-os rövid szakasza, Bx7 promóter a 2. cisz-regulációs modul deléciójával (CRM2del), illetve mutációjával (CRM2M, Myb és VP1 transzkripciós faktor kötőhelyek elmutálva a CRM2-ben), kettős mutáns (ABRE|CBF csere, CRM2del). *: 90%-os, **: 95%-os szinten szignifikáns eltérés a vad Bx7 promotertől

Hiszton-acetiláció szerepének vizsgálata: Egy az utóbbi időben megjelent publikáció (Guo és mtsai. 2015) alapján a transzkripcionális szabályozáson túl epigenetikai tényezőknek is, egészen pontosan a hiszton-acetilációnak is lehet szerepe a búza HMW GS gének szövetspecifitásának szabályozásában. Erre korábban semmi sem utalt a szakirodalomban – a HMW glutenin alegység génekről azt tartották, hogy leginkább transzkripcionálisan szabályozódnak – így szükségesnek tartottuk tesztelni Guo és mtsai. eredményeit.

Ehhez együttműködés keretében, az ELTE-n előállított Bx7 promóter :: GUS riporter génn és By9 promóter :: GUS riporter génn konstrukciót hordozó transzgenikus árpamagokat csíráztattunk kontroll körülmények között, illetve 15 μ M Trichostatin A (TSA) hiszton deacetyláz inhibitor mellett. A TSA hiszton hiperacetylációt okoz, így ektopikusan, a célszerven kívül be tud kapcsolni olyan géneket, amelyek így szabályozódnak. A TSA-t csak a csírázástól számított 4. Nap után kapták a növények, mivel – szakirodalmi adatok szerint – gátolhatja magát a csírázást. Több független transzgenikus vonalat vizsgáltunk, hogy kiküszöböljük a pozíció-hatásból eredő eltéréseket, vagyis hogy a transzgen különböző genomi pozícióba épülhetett be, ami befolyásolhatta a HMW GS promóterek aktiválását. Eredményeink szerint a TSA-kezelt Bx és By promóter :: GUS riporter génn konstrukciót hordozó transzgenikus árpa magoncok koleoptiljában specifikusan, hosszan festődött az edénnyaláb (**ld. 1.4.3. e, f, k, l ábrák**). A transzgenikus árpák gyökere és hajtás más része, illetve a nem transzgenikus növények nem festődtek (**1.4.3. ábra**). Alkalmanként a TSA-val nem kezelt Bx és By promótert hordozó növények edénnyalábjában is láttunk – foltokban – festődést (**ld. 1.4.3. b ábra**), folyamatos jelet azonban nem kaptunk.

Mindez megerősíti Guo és mtsai. eredményeit a hiszton-acetylációs szabályozás fontos szerepéről. A kialakított kísérleti elrendezéssel a továbbiakban búza vagy Brachypodium csíranövényeken, egyszerűen (pl. qPCR-el, Western blottal) vizsgálható, hogy mely prolamin gének szabályozásában lehet még szerepe a hiszton-acetylációnak. Kutatásunkat Tanaka és mtsai. (2008) munkája inspirálta. A szerzők hasonló módon, TSA kezeléssel ektopikusan, vagyis a célszöveten kívül be tudtak kapcsolni embriógenézissel kapcsolatos géneket, sőt a kezelt Arabidopsis leveleken embriószerű struktúrák fejlődtek. Így igazolták, hogy az embriógenézisben szerepet játszó gének hiszton-acetylációval szabályozódnak. Tian és mtsai. (2005) munkája alapján Arabidopsisban csak a gének 7-10%-a áll ilyen típusú szabályozás alatt. A HMW GS gének specifikus szivárgása edénnyalábokban érdekes jelenség, és eddig – tudomásunk szerint – nem írták le a szakirodalomban. Magyarozatot kínálhat rá, hogy bár a prolamin gének aktiválásában kulcsszerepet játszó SPA bZIP transzkripciós faktorok endosperm specifikusak, de a hiszton acetyltransferázokat toborzó GAMYB faktor jelen van a szállítószövetekben. A prolaminok szabályozásában szintén fontos szerepet játszó DOF faktorok pedig a növény minden részében megtalálhatók (összefoglalta: Kawakatsu és mtsai. 2010). Ráadásul ismert a GAMYB és DOF transzkripciós faktorok interakciója is (Diaz és mtsai. 2005), így ez a két faktor elvileg okozhatja HMW GS gének enyhe szivárgását a szállítószövetekben, melyet a TSA-kezelés felerősít. Saját korábbi eredményeink (Juhász és mtsai. 2011) alapján az endospermium fejlődésének kezdeti szakaszában is a GAMYB és DOF faktorok biztosíthatnak a prolamin géneknek egy alap aktivációt, amikor még a SPA bZIP transzkripciós faktor nem termelődik.



1.4.3. ábra: hiszton-deacetiláz inhibitor (TSA) kezelések eredményei. Sztereomikroszkópos képek (a-j). Kezeletlen, nem transzgenikus Golden Promise árpa (a), By9 promóter :: GUS-konstruciót hordozó (b) és Bx7 :: GUS konstruciót (c) hordozó transzgenikus árpa magoncok. TSA-kezelt (15 μ M) nem transzgenikus Golden Promise árpa (d), By9 promóter :: GUS-konstruciót hordozó (e) és Bx7 :: GUS konstruciót (f) hordozó transzgenikus árpa magoncok. Hipokotil-keresztmetszetek (g-l). Kezeletlen, nem transzgenikus Golden Promise árpa (g), By9 promóter :: GUS-konstruciót hordozó (h) és Bx7 :: GUS konstruciót (i) hordozó transzgenikus árpa magoncok. TSA-kezelt (15 μ M) nem transzgenikus Golden Promise árpa (j), By9 promóter :: GUS-konstruciót hordozó (k) és Bx7 :: GUS konstruciót (l) hordozó transzgenikus árpa magoncok.

Transzkripciós faktorok izolálása: munkánk további részében a búza és Brachypodium tartalékfehérje promoterekhez kapcsolódó transzkripciós faktorok izolálásán dolgozunk. DNS-affinitás kromatográfiával az elmúlt évben több nukleinsav-kötő fehérjét, pl. riboszómális fehérjék, hisztonok sikerült tisztánunk, transzkripciós faktort azonban nem. *In vitro* rendszerben nehézségekbe ütközhet a sejtmagban lévő kondíciók modellezése és ez gyengítheti a transzkripciós faktorok DNS-hez való kötődését. Éppen ezért *in vivo* módszer kifejlesztésébe fogtunk. A módszer biotinilált DNS biolisztikus transzformációján, majd formaldehides fixációt követő visszanyerésén alapul növényi szövetekből, az egymáshoz kapcsolódó fehérjékkel együtt. A módszer ígéretesnek tűnik, a transzformált DNS 5-10%-át valóban sikerült visszanyerni. A növények aurin-trikarboxilsavval (nukleázgátló) történő előkezelése javította a módszer hatékonyságát. Riboszómális fehérjéket és hisztonokat már ilyen módon is sikerült izolálni. A módszer

további optimalizációjával a közeljövőben transzkripciós faktorok izolálása várható. Ezen faktorok fontosak lehetnek a gabona tartalékfehérjék transzkripcionális szabályozásában, kódoló génjeik nemesítési célobjektumok. Bioinformatikai elemzéseink éppen azt mutatták, hogy pl. az egyes búza HMW GS tartalékfehérje-gének alléljeinek promóterei nem különböznek egymástól annyira, hogy az az expresszióbeli különbségeket indokolná. Így az egyes búzafajták eltérő transzkripciós faktor-összetétele lehet a magyarázat és nem másra, mint a transzkripciós faktor-génekre érdemes nemesíteni, hogy jobb minőségű és stabilabb termőképességű gabonát kapjunk (Makai és mtsai. 2014; Makai és mtsai. 2015). A projekt egy résztvevője, Éva Csaba posztdoktori kiválósági pályázatot (PD_16; PD 121322) nyert a 2016-2019-as időszakra. Az ott vállalt kutatás témája átfed jelen OTKA pályázatával, így Csaba be tudja fejezni a fennmaradó laborkísérleteket és az eredményekből a csoport két további nemzetközi publikációt tervez megjelentetni.