

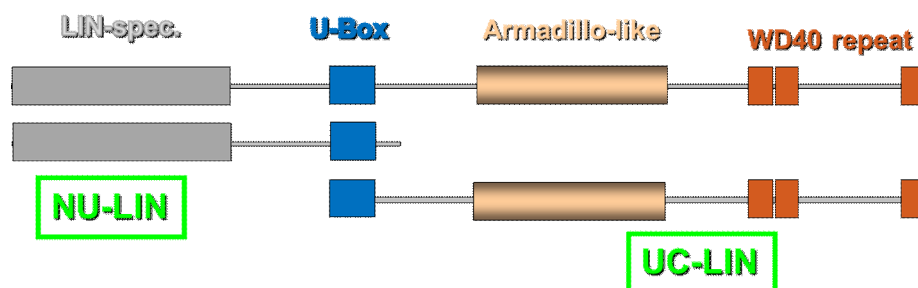
Egy új, a szimbiotikus gümőfejlődésben szerepet játszó ubiquitin ligáz funkcionális jellemzése

A tervezett munka a kutatócsoportunkban korábban genetikai térképezésen alapuló génizolálással azonosított új szimbiotikus lucerna gén, a *LIN* által kódolt fehérje sokoldalú: funkcionális, kifejeződésbeli és lokalizációs vizsgálata volt.

A *LIN* gén egy ~ 1500 As hosszú fehérjét kódol, melyben a legerősebb homológia egy ún. U-box domént jelölt, így feltételezhető volt, hogy a *LIN* fehérje E3 ubiquitin ligáz aktivitással bír. Célunk a *LIN* fehérje funkciójának jellemzése, a gümő organogenezisében és a baktérium invázióban betöltött szerepének meghatározása. Ehhez a terveket követve számos plazmid konstrukciót állítottunk elő, melyek a használt kísérletes megközelítések – növényi transzformációk, fehérje kifejeztetések és vizsgálatok különböző rendszerekben – révén lehetővé tették a *LIN* fehérje *in vivo* funkcionális vizsgálatát és sejten belüli lokalizációjának feltárását, a fehérje részleges tisztítását és ubiquitin ligáz aktivitásának ellenőrzését *in vitro* kísérletekben, valamint lehetséges köcsönható partnerek keresését.

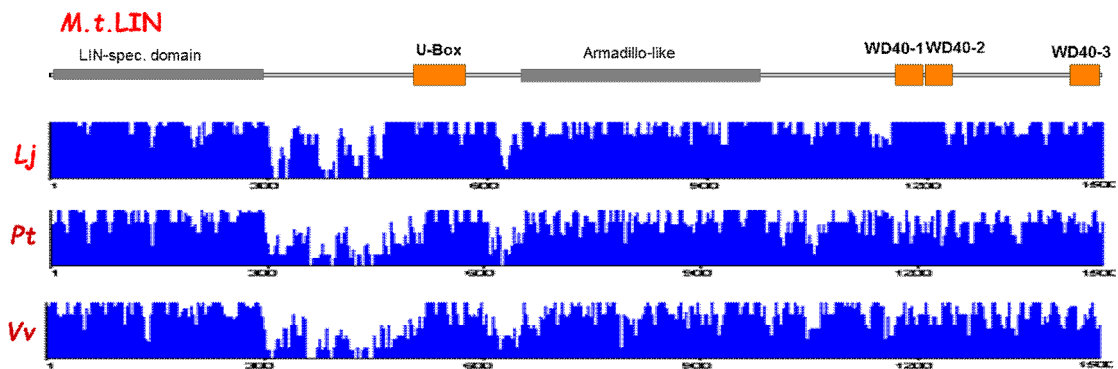
Klónok előállítása, homológok azonosítása és klónozása

A Gateway klónozási stratégiát használva a *Medicago truncatula* *LIN* gén teljes kódoló szekvenciát, valamint deléciós származékokat (az N-terminális részt az U-box végéig /NU-LIN/, ill. az U-box kezdetétől a fehérje végéig kódoló részt /UC-LIN/; 1. ábra), és a gén 5' upstream régiója különböző hosszúságú szakaszait először az ún. 'entry' vektorba klónoztuk, szekvenálással ellenőriztük, majd különböző génexpressziós vektorokba, ill. növényi transzformációra alkalmas vektorokba rekombináltattuk a detektálást segítő ún. fluorescens protein (FP) 'tag'-, vagy riportergén fúziókban.



1. ábra: Teljes hosszúságú *LIN* fehérje (felül) és deléciós származékai

Bioinformatikai módszerekkel tovább elemeztük a *M. truncatula* szimbiotikus funkcióval rendelkező LIN fehérje doménfelépítését. Kizárólag növényi homológokat találtunk nagyfokú aminosav hasonlósággal, melyek közül kettő fajból (nyárfa /*Populus trichocarpa*/ , ill. szőlő /*Vitis vinifera*/ szekvenciák) teljes domén-megegyezést mutató fehérjéket azonosítottunk, ezek elnevezése: PtLIN és VvLIN (2. ábra).



2. ábra: LIN fehérje homológok aminosav sorrendjének hasonlóságát jelző grafikon (*M. truncatula* LIN-hez viszonyítva)

A többi azonosított, részleges domén-egyezeit mutató fehérjét egy másik csoportba soroltuk, és ezen család tagjait egyelőre nem-szimbiotikus LIN néven jegyezzük és vizsgáljuk. Kiderült, hogy nemcsak az egyszikűek között, hanem még páfrányban (*Adiantum capillus-veneris*) is megtalálható a LIN gén homológja. Ezen homológok egy részéből (melyek tehát más, nem-pillangósvirágú növényből származnak és LIN homológ fehérjét kódolnak) szintén előállítottunk megfelelő plazmid-konstrukciókat és funkcionális vizsgálatokat végeztünk azokkal.

In vitro E3 ubiquitin ligáz aktivitás tesztek

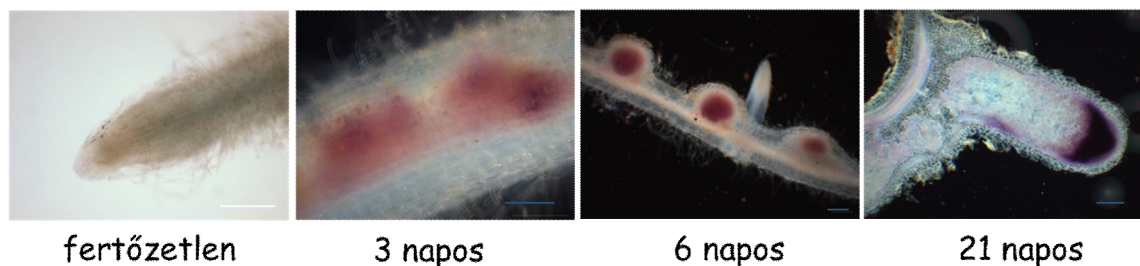
A *Medicago truncatula* LIN fehérje *in vitro* kifejeztetéséhez többféle expressziós vektort, gazdabaktériumot és különböző körülményeket is létrehoztunk, ill. teszteltünk, azonban a teljes génterméket sokáig nem sikerült megkapnunk. Sikeresnek bizonyult ugyanakkor a LIN gén fentebb említett két deléciós származékából kifejeztetni a parciális fehérjéket, ezért ezeket teszteltük először *in vitro* ubiquitinációs kísérletekben. A körülmények optimalizálását követően ki tudtuk mutatni mindkét fehérje darab ubiquitin ligáz aktivitását „semleges” bakteriális fehérjéken (nem specifikus ubiquitináció). A későbbiekben több kísérleti körülmény változtatásával aztán sikerült optimalizálni a teljes fehérje kifejeztését és megfelelő tisztításával aktivitása megtartását. Az így tisztított teljes hosszúságú LIN fehérje is mutatta az ubiquitin ligáz aktivitást az *in vitro* tesztben. Az *in vitro*

ubiquitinációs kísérleteket lehetséges kölcsönható partnerekkel, már leírt szimbiotikus fehérjékkel folytattuk, melyek tesztelése további kísérleti optimalizálásokat igényelt. A rendszer sikeres beállítását követően teszteltünk néhány ismert szimbiotikus fehérjét mint a LIN potenciális ubiquitinációs célpontját, és az egyik transzkripciós faktor esetében pozitív eredményt kaptunk. Ezek alapján azonosítottunk legalább egy fehérjét, melynek szabályozásában a LIN nagy valószínűséggel részt vesz a nitrogénkötő szimbiózis kialakítása során.

A gén kifejeződésének vizsgálata

A tervek szerint elvégeztük az RNS izolálásokat különböző *M. truncatula* szövetekből, és Real Time PCR kísérletekben meghatároztuk a LIN gén expresszióját. Eredményeink alapján a gén elsősorban a gyökérben és a korai, ill. érett gümőkben fejeződik ki, ezek között nincs jelentős eltérés, tehát itt nem beszélhetünk igazán szimbiotikus expresszió növekedésről. A levélben viszont csak ötödannyi mRNA található, míg szárban még ennél is egy nagyságrenddel kevesebb.

A különböző promóter-riportergén és LIN-riportergén fúziós konstrukciókat *Agrobacterium rhizogenes* segítségével előállított transzgenikus gyökerekben, valamint *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette tranziens expresszióval dohány levelekben is vizsgáltuk. A *M. truncatula* LIN promóter – GUS riportergén fúziók (három különböző hosszúságú szakaszt is klónoztunk) kifejeződését transzgenikus gyökerekben és a szimbiózis különböző fázisaiban lévő gümőkben nyomon követve képet kaptunk a klónozott promóter szakasz aktivitásáról (3. ábra). A vizsgált 5' upstream régió különböző hosszúságú szakaszai szimbiózis-specifikus aktivitást mutattak a transzgenikus gyökerekben. Az eredményekből kitűnik, hogy a szimbiotikus szövetekben a mutáns fenotípus alapján várt sejtrétegekben tapasztalható az aktivitás. Ugyanakkor a fertőzetlen gyökérben ez a promóter nem biztosította a riportergén kifejeződését, míg az eredeti LIN mRNA kimutatható volt ebben a szövetben is, tehát elmondhatjuk, hogy egy a klónozott szakaszon kívüli régió kell, hogy felelős legyen ezen gyökér aktivitásért.



3. ábra: LIN promóter aktivitásának vizsgálata GUS riportergén segítségével *M. truncatula* gyökéren és gümőkben.

A fehérje kimutatása, lokalizációja

Floureszcens transzlációs fúziók vizsgálatával

A *M. truncatula* LIN fehérje különböző fluoreszcens tag-gel jelölt változatait (FP-LIN, LIN-FP) expresszálo klónokat is előállítottunk sokféle változatban. A teljes fehérjén kívül a NU-LIN és UC-LIN deléciós változatait is kifejeztettük CaMV 35S promóterrel, valamint saját promóterekkel is. Ezeket 'hairy root' transzformálással vad típusú *M. truncatula* gyökerekben, illetve tranziens expresszióban *Nicotiana benthamiana* levélben is vizsgáltuk, valamint stabil transzformáns *Medicago* és dohány vonalakat is előállítottunk. A konfokális mikroszkóppal kapott képeken a GFP tag-et N-terminálisan hordozó teljes LIN fehérje mindegyik kísérleti rendszerben ritkán volt látható, ám ilyenkor mindig azonos: ER- és sejtmag(membrán)-specifikus sejten belüli elhelyezkedést mutatott. Hasonló eredményt mutattak a FP tag-et a fehérje C-terminális végén hordozó LIN konstrukciók is. A fehérjék detektálásának alacsony hatásfoka miatt a fluoreszcens tag-gel jelölt változatokat előállítottuk egy új bináris vektorban is, ahol a transzformációs gyakoriság egy függetlenül kifejeződő DsRed fluoreszcens fehérjének köszönhetően könnyen követhető volt. Ezáltal megállapítottuk, hogy a 'hairy root' transzformálások és a tranziens expressziós kísérletek jó arányban (50-85%-ban) voltak pozitívak, azonban a LIN fehérje detektálása csak 1-8 %-ban volt lehetséges. Kísérleteink alapján feltételezzük, hogy a *M. truncatula* LIN elsősorban nem a transzkripció szintjén szabályozódik, hanem a reguláció a fehérje, vagy aktív fehérje mennyiségének szintjén fejeződik ki.

Több homológ LIN gén FP 'tag'-gelt változatával is elvégeztük ezen kísérleteket, mindegyikkel hasonló eredményt kaptunk. A stabil transzgenikus vonalakban sem lehet detektálni a bevitt LIN fehérjeváltozatot jelző fluoreszcens jelet (PCR-rel ellenőrzött vonalak, ahol a bevitt gén expressziója is kimutatható) sem *M. truncatula* növénynél, sem a dohány transzformánsoknál.

A fehérje részei ellen termeltetett ellenanyagok segítségével

Egy másik detektálási módszerrel, Western kísérletekben is próbáltuk a fehérjét növényi anyagból kimutatni. A FP-ekre használatos ellenanyagok mellett a biztosabb kimutatás érdekében termeltettünk ellenanyagot a LIN fehérje specifikus N-terminális domén, majd a fehérje U-box doméntól 3' irányban elhelyezkedő szakasza ellen. Az ellenanyagok működtek, az *E. coli* baktériumban termeltetett és részlegesen tisztított LIN fehérjéket ki tudtuk mutatni a Western kísérletekben, optimális használatuk meghatározása ezeken nem okozott problémát. Azonban nem tudtuk velük a LIN fehérjét kimutatni a *M. truncatula* gyökerekben sem a vad típusú gyökerekben,

sem azokban a transzgenikus gyökerekben, melyekben az expressziójukat megnöveltük. Ezekben a transzgenikus 'hairy root' gyökerekben Real-Time RT-PCR-rel megnéztük a bevitt *LIN* transzgén kifejeződését, és azt találtuk, hogy a CaMV35S promóterrel várható nagyfokú túltermelés nem figyelhető meg már RNS szinten sem, a kapott transzgén expressziója az endogén *LIN* expressziójának max. másfél-kétszerese volt csak. Ez azt jelzi, hogy egyfajta szabályozás a *LIN* túltermeltetése ellen már RNS szinten is jelentkezik. Viszont nem magyarázza teljes egészében a fehérje detektálásának hiányát, így feltételezhető, hogy maga a fehérje is szigorú reguláció alatt van. Ugyanezt az eredményt kaptuk az NU-*LIN* deléciós származék vizsgálatánál is, míg az UC-*LIN* parciális fehérjét ki tudtuk mutatni. Ez azért biztató, mivel jelzi számunkra, hogy a fehérje mely része hordoz olyan információt, mely instabillá teheti.

Mivel egy E3 ubiquitin ligázról van szó, adott a lehetőség, hogy a fehérje képes lehet önmagát is megjelölni ubiquitinnel, így biztosítva saját gyors proteozómán keresztüli degradációját. A fentebbi eredmények is arra ösztökéltek minket, hogy tesztelnünk kell a *LIN* fehérje stabilitását a különböző rendszerekben. Ezért az FP-*LIN* fehérjét kifejező transzgenikus *M. truncatula* gyökereket, valamint a tranziens expresszióhoz infiltrált *N. benthamiana* leveleket is MG132 nevű vegyülettel kezeltük, mely leállítja a proteozóma működését, és ezt követően néztük a fluoreszcens aktivitást, vagy végeztünk Western kísérleteket. Több alkalmazási körülményt is kipróbáltunk az MG132 adására, de a korábbi ritka fluoreszcens jelekben nem tapasztaltunk erősödést, és egyik esetben sem sikerült a *LIN* fehérje ellenanyaggal történő kimutatása. Ez egyrészt jelentheti azt, hogy még technikailag nem találtuk meg a kellő körülményeket, azonban azt is jelezheti, hogy a fehérje szabályozása más módon (is) történik.

Szimbiotikus funkció vizsgálata – komplementációk

A mutáns növényen végzett funkcionális komplementációs tesztekben transzgenikus gyökereket hoztunk létre különböző gén-konstrukciókkal, ezeket *Rhizobium* baktériumokkal fertőztük és részletesen jellemeztük a kapott szimbiotikus fenotípust. Pozitív eredményt kaptunk a *M. truncatula* *LIN* és UC-*LIN* konstrukciók kifejeztetésével 'hairy root' gyökerekben (4. ábra), melyet a nitrogénkötő gümők megjelenése jelzett, míg a NU-*LIN* deléciós származék nem volt képes komplementálni a mutánst.

Azt is kiderítettük, hogy a *M. truncatula* *LIN* gén különböző FP 'tag'-gel jelölt változatai (FP-*LIN*, *LIN*-FP) is képesek a komplementálásra, tehát a használt 'tag'-ek nem gátolják a funkciót. Mindezen komplementációknak a hatékonysága viszont alacsony, tíz százalék alatt volt a használt CaMV35S promóterrel meghajtott génkonstrukciókkal. Mivel a vad típusú *M. truncatula* transzgenikus gyökerekben ritkán detektáltuk a fluoreszcens jelet (ld. feljebb), az FP 'tag'-gelt

változatokat használva a komplementált, vagyis gümöző gyökereken is kerestük a jelzett fehérje megjelenését, de nem tudtuk detektálni konfokális mikroszkóppal sem.



4. ábra: Komplementációs kísérlet eredménye *lin-1* mutáns 'hairy root' gyökereken.

A szimbiotikus Rhizobium baktériumokat kék festés jelzi. A GFP függetlenül kifejeződő génként van jelen,, a transzgenikus gyökér felismerését segíti.

Látva a CaMV35S promóterrel kifejeztetett génkonstrukciók alacsony komplementációs határfokát arra gondoltunk, hogy talán az extra túltermeltetés hatására következik be egy szigorú negatív reguláció a bevitt *LIN* gének/fehérjék ellen. Ezért elkészítettük a *Medicago LIN* gén saját promóterével meghajtott változatokat is, és megismételtük a komplementációs kísérleteket. Ekkor már sokkal jobb eredményt kaptunk: a transzgenikus gyökerek akár 50-70 %-án is megjelentek az aktív szimbiotikus gümők. Ezekben a kísérletekben is az FP 'tag'-gelt változatokat használva a komplementált, vagyis gümöző gyökereken ismét kerestük a jelzett fehérje megjelenését, de nem tudtuk detektálni azt.

A *LIN*-nek a már azonosított egyéb szimbiózis-specifikus gének funkciójához viszonyított helyzetét is jellemeztük azáltal, hogy ezen gének expressziós mintázatát vizsgáltuk a *lin* mutáns háttérben. A vizsgált szimbiotikus gén promóter-GUS fúziós konstrukciók közül a korai szimbiotikus gének promóterei aktívnak bizonyultak - bár az ENOD12 gén promóter aktivitásának indukciója elmaradt a vad típusú reakciótól.

Transz-komplementációs tesztek is végeztünk a nyárfá és szőlő *LIN* homológ génekkel előállított konstrukciókkal, és mind a *PtLIN*, mind a *VvLIN* homológ képes volt a mutáns egyed szimbiotikus funkciójának bizonyos fokú helyreállítására. A szimbiotikus folyamat tovább tudott menni mint a mutánsban, kialakultak igazi gümők, különbséget inkább csak ott venni észre, hogy kevesebb szimbionta baktérium tudott bejutni ezekbe a gümőkbe. A vizsgált nem-pillangósvirágú növényekből származó *LIN* homológ gének 35S promórral meghajtva tehát részlegesen tudták komplementálni a mutációt. Azonban azt is láttuk, hogy maga a *M. truncatula* vad típusú gén is

jobban “működött” saját promóterével meghajtva, ezért elkészítettük azokat a konstrukciókat is, melyekben a *homológ LIN* géneket a *Medicago LIN* promóterével fejeztettük ki. Elvégezve ezekkel a komplementációs kísérleteket azt kaptuk, hogy ezeknél is sokkal jobb hatékonysággal jelentek meg szimbiotikus gümők a transzgenikus gyökereken, s ezek teljes egészében aktívnak bizonyultak. A vizsgált nem-pillangósvirágú növényből származó LIN homológ gének tehát képesek voltak betölteni a *M. truncatula LIN* gén szimbiotikus funkcióját.

Kölcsönható partner jelölt *in vivo* megerősítése

Az esetleges interakciók teszteléséhez már a munkák korai szakaszában elvégeztük a *LIN* gén BiFC kísérletekhez alkalmas (split-YFP) vektorokba történő klónozását annak reményében, hogy majd számos jelöltet tesztelhetünk ily módon *in vivo* kölcsönhatásra. Miután tehát az *in vitro* ubiquitinációs tesztben egy szimbiotikus transzkripció faktor pozitívnak bizonyult (vagyis a LIN ubiquitinációs célpontja lehet), ezt a gént is split-YFP vektorokba klónoztuk. *N. benthamiana* levelekben történő infiltrálással transzienten expresszáztunk megfelelő párosításokban (kontrollok mellett) ezeket a LIN-nel. A több ismétlésben elvégzett kísérlet sorozat, melyek során egy hasonló szimbiotikus transzkripció gént is vizsgáltunk a LIN-nel párosítva, egyértelműen bizonyította a jelölt kölcsönható partner pozitív interakcióját a LIN fehérjével *in vivo* is.

További kölcsönható partnerek keresése

Olyan plazmid konstrukciókat is előállítottunk, melyek - arra alkalmas különböző célvektorokba klónozva - lehetővé tették a *LIN* élesztő kettős hibrid rendszerben (Y2H) történő kifejeztetését, a teljes gént kódoló konstrukció mellett különböző deléciós származékokat is klónoztunk. Az élesztő kettős hibrid rendszer vektorában előállított konstrukciókkal egy régebbi (Györgyei J. és mtsai. által létrehozott) *Medicago* génbankban kerestünk esetleges kölcsönható partnert. A teljes gént kódoló szekvenciával nem kaptunk egyetlen pozitív jelölt klónt sem, míg az egyik deléciós szekvenciával három potenciális partner adott pozitív reakciót, ám ezt később a páronkénti tesztekkel nem sikerült alátámasztani. Feltételezve, hogy a jelen lévő U-box domén esetleg gátolhatja stabil interakció megjelenését, készítettünk egy új deléciós LIN változatot, melyből ez hiányzik. Elvégeztünk így egy új 'screen'-t, melyből három potenciális klónjelölt jött ki pozitívnak, de a páronkénti tesztekben ezeket sem sikerült alátámasztani.

Az eddig ismert szimbiotikus gének közül számba jöhető esetleges interaktorokat is beklónoztuk Y2H vektorokba, de a páronkénti tesztekben egyik sem bizonyult pozitívnak a LIN-nel. Még az *in vitro* ubiquitinációs tesztben pozitív transzkripció faktor sem adott pozitív jelet, így lehet, hogy a Y2H nem a legjobb rendszer a LIN interaktorok azonosítására. Azonban még egy

lehetőségünk adódott: egy külföldi laboratóriummal kooperációban tesztelhattunk egy új *M. truncatula* Y2H génbankot. Ennek eredményeként négy új lehetséges fehérjét azonosítottunk, ezek kölcsönhatásának megerősítése még nem történt meg.

A projekt munkatervében vállalt feladatokat elvégeztük, a különböző megközelítésekkel végzett kísérletek eredményei révén fontos új ismeretekkel gazdagodtunk a *Medicago* LIN fehérje és homológ társai funkciójáról. A fent bemutatott fehérjés munkáknak, ubiquitinációs kísérleti rendszereknek a beállítása hosszú időt vett igénybe, az irodalomban sem volt még túl sok követhető példa, számos körülmény optimalizálását el kellett végeznünk. Több olyan kísérletet is indítottunk, melyben már ismert szimbiotikus gént is kifejeztünk a *LIN* mellett, hogy azok stabilitását vajon befolyásolja-e a LIN az adott rendszerben (elsősorban koinokuláció *N. benthamiana* rendszerben), ám konkluzív eredményt egyelőre nem sikerült kapnunk. Számos negatív eredményt is adó kísérlet nem volt hiábavaló, hiszen ezeket is tudtuk értelmezni, ugyanakkor ezek bizonyítása - a nyilvánvalóan többféle kontrollal történő bizonyítása miatt - hosszabb időt vett igénybe. Ennek következtében az eredményekből számos konferencia előadás és poszter mellett egy IF-os publikáció (*Plant Physiology*) született, két másik kézirat jelenleg beküldés alatt van, egy harmadik pedig előkészületben.