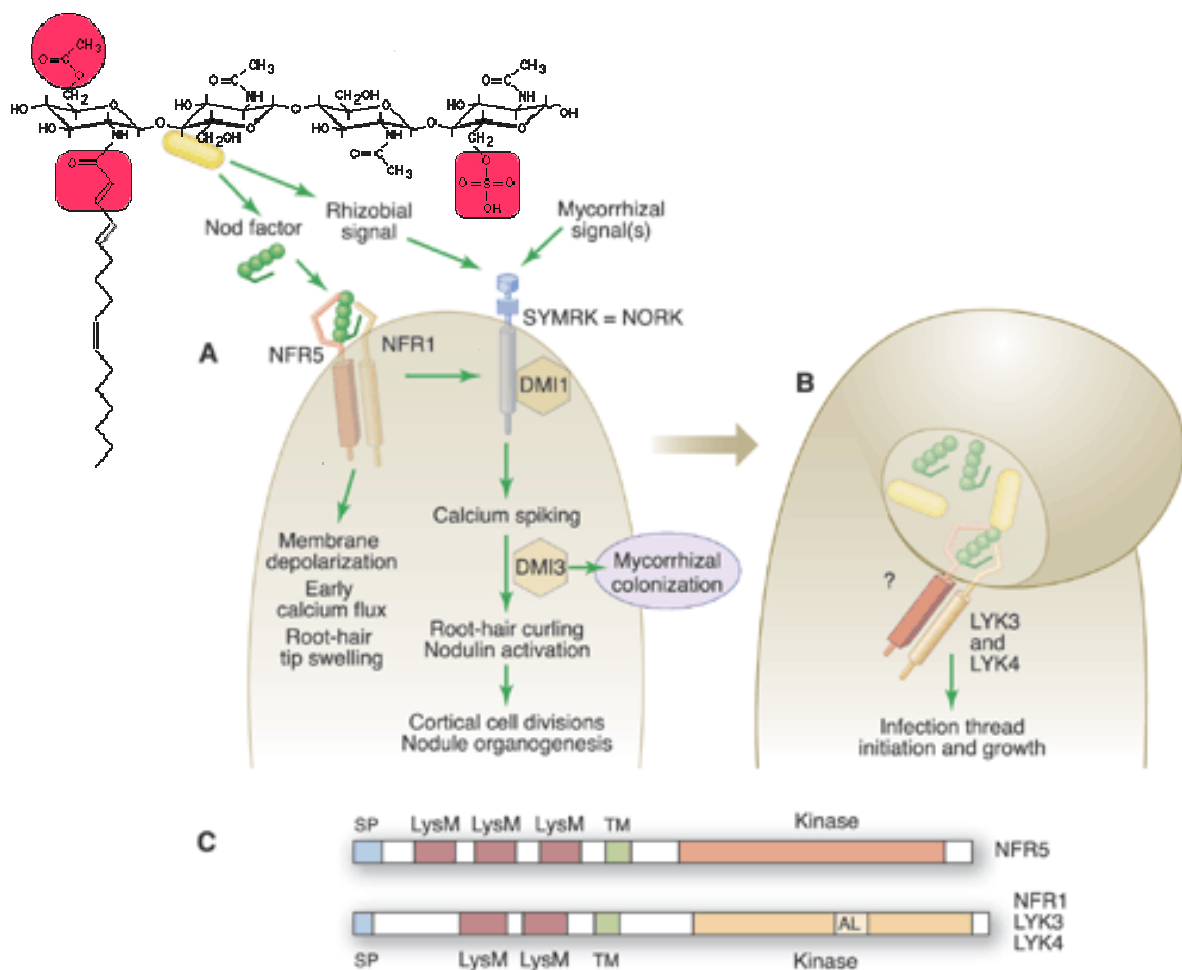


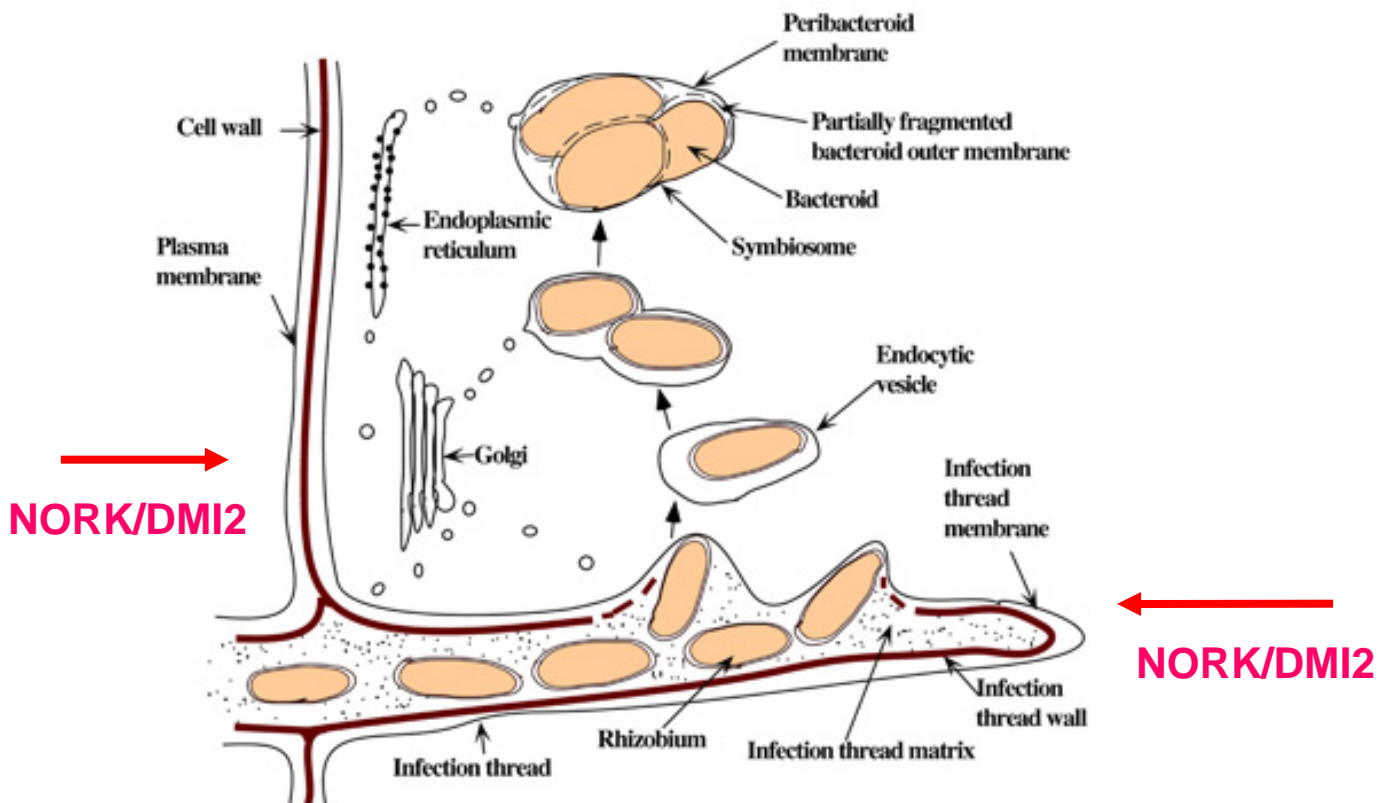
Az eredmények összefoglalása

Szimbiotikus nitrogénkötés

A modell rendszerünknek választott *Sinorhizobium meliloti* baktérium és a lucerna, *Medicago sativa* szimbiotikus kapcsolatának felderítéséhez vizsgáljuk a génlónozással azonosított *nork* gén által kódolt receptor fehérjét. A NORK (NOdule specific Receptor Kinase) receptor kináz típusú fehérje feltehetően a baktérium által kibocsátott un. Nod faktor felismerésében és a gümőképződés biológiai folyamatának beindításában játszik szerepet (1. ábra.) (Cullimore 2003). A fehérjét a szimbioszóma képződés során a plazma membránban és az infekciós fonal membránban lokalizálták (2. ábra.) (Limpens 2005).



1. ábra. Nod -faktor érzékelés folyamata



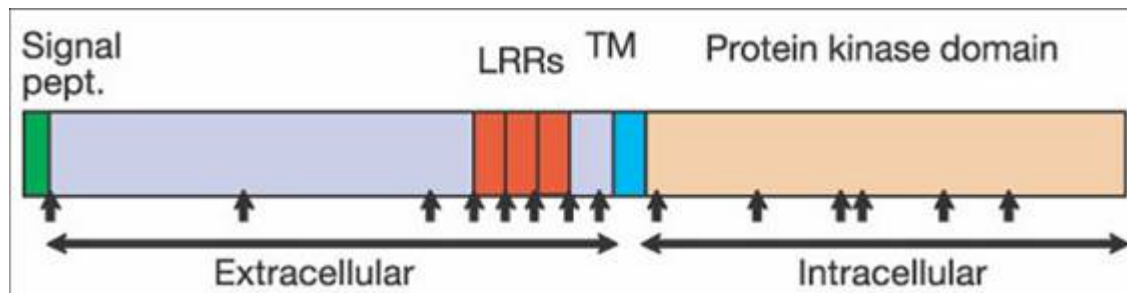
2. ábra. NORK lokalizálása a szimbioszóma képződés során

Célunk a NORK fehérjének, mint a lucerna szimbiotikus nitrogénkötés kialakításában kulcsfontosságú szerepet játszó receptor fehérjének molekuláris jellemzése volt, beleértve biokémiai tulajdonságainak felderítését, a fehérje azonosítását, lokalizálását, szerkezetének igazolását, valamint a szignál transzdukció kaszkád lépéseiből minél több elem azonosítását, amelyek valamilyen formában, kapcsolatban állnak a NORK fehérjével.

NORK szerkezete

A 925 aminosavból álló receptor kináz molekula három fő szerkezeti doménből áll, egy extracelluláris (1-517), egy hidrofób transzmembrán (TM) (518-545) és egy intracelluláris (546-925) szerkezeti egységből. Az extracelluláris domén a szignál peptid (1-28) mellett egy egyedi szekvenciát hordozó NORKE (29-406) (NORK Extracelluláris domén) domént, 3 LRR-t (407-482) (Leucine Rich Repeat), az intracelluláris szerkezeti egység pedig aktív kináz

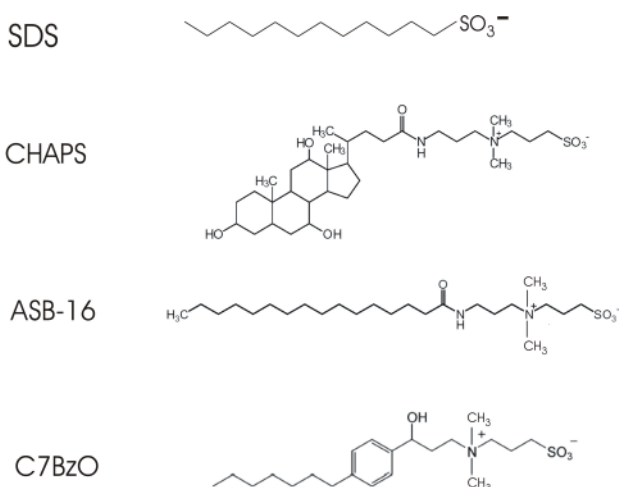
domént tartalmaz. A C terminális kináz régió tartalmazza a kinázokra jellemző konzervatív aminosav szekvencia szakaszokat az enzim katalitikus helyét meghatározó szekvenciával együtt DVKSSN (3. ábra.) (Endre 2002)



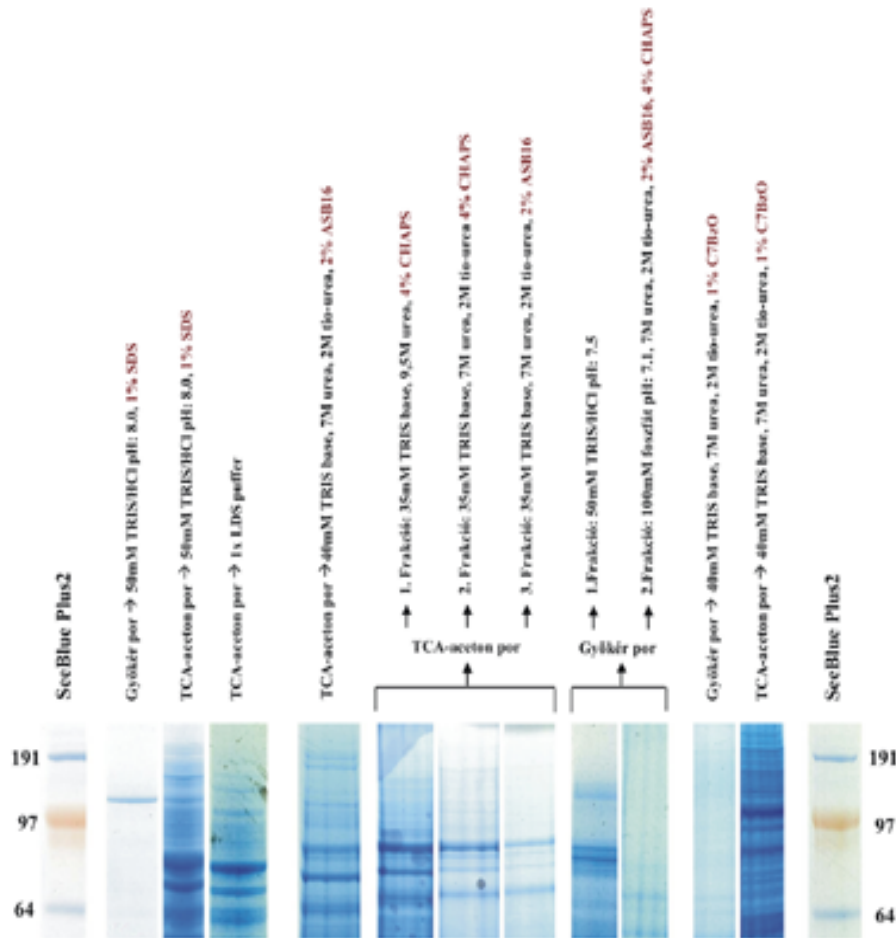
3. ábra. NORK szerkezete

Receptor fehérje izolálása lucerna gyökérből.

A lucerna gyökér sejttal mechanikai feltárása közvetlenül cseppfolyós nitrogénben történt elporítással. Különböző detergenssek (SDS, CHAPS, ASB16, C7BzO) a sejtmembrán felbontását segítették elő (4. ábra), TCA/aceton a növényi fenolokat, proteáz inhibitorok az aktív proteázokat hatástalanították, míg a szonikálás a nukleinsavak tördelését eredményezte. A gyökér extraktumokat ezek után SDS gélelektroforézissel Novex Bis -Tris rendszerben, MOPS/SDS futtató pufferben analizáltuk és a Coomassival festett géleken ellenőriztük, hogy a feltárt sejt lizátum tartalmaz -e NORK méretű fehérjét (100KDa) (5. ábra).



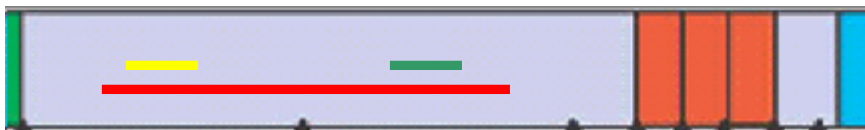
4. ábra. Detergenssek szerkezete



5. **ábra.** Lucerna gyökér extraktum elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel, detektálása Coomassie Blue G250 festékkel.

Fehérjék azonosítása immundetektálással

A kimutatás egyik alapfeltétele, hogy rendelkezésünkre álljon megfelelő ellenanyag. Az ellenanyag készítéséhez antigéneket állítottunk elő a NORKE doménből választott immunogén szekvenciák alapján.



6. **ábra.** Az ellenanyagok előállításához kiválasztott antigének helye a NORKE extracelluláris részén
 Piros: alfa NORK 33-349 Sárga: G3 67-81 Zöld: BV 222-236

Antigének előállítása

Peptide epitop előállítása szintetikus úton

A G3 és BV ellenanyag előállításához a peptid epitop antigént szilárd fázisú peptid szintézissel állítottuk elő, amit azután BSA-hoz konjugáltunk.

Rekombináns DNS technikával készült fúziós fehérje előállítása GST prokarióta expressziós rendszerben, alfa-NORK ellenanyag előállításához

A NORKE domén 2. és 3. exonját használtuk antigénként az alfa NORK ellenanyag előállításához. A további tisztítás végett a fehérje szakaszt GST-vel fuzionáltattuk a következő konstrukció segítségével.

A pTrcHisA konstrukcióból a *M. truncatula* A17 NORK gén 2. és 3. exonját pGEX-4T-3 vektor BamH I/EcoR I helyére klónoztuk át. Az elkészített konstrukció:

kék: GST (Glutathione S- Transferase) szekvencia;

barna: NORK 2. exon;

rózsaszín: NORK 3. exon;

fekete: a pTrcHisA vektorból származó szekvencia (7. ábra a szöveg után).

A konstrukciót *E. coli* TOP10 baktériumtörzsbe transzformáltuk, szekvenáltuk és termeltettük a fehérjét. A termeltetett fúziós fehérje tisztítása egy lépésben Sepharose 4B hordozóra kötött glutation oszlopon történt, majd a részlegesen tisztított fehérje preparátumból a megfelelő mérettartományú fehérjét (~ 62 kDa) elválasztás után akrilamid gélből izoláltuk. Az izolált fehérje mennyisége 150 µg volt.

pGEX-4T-3Bam

```
ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT
M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L
TTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAA
L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K
TGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATATTGAT
W R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D
GGTGATGTTAAATTAACNCACTATGGCCATCATACGTTATANANCTGACAAGCACAAAC
G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N
ATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTG
M L G G C P K E R A E I S M L E G A V L GST
GATATTAGATACGGTGTTTCCAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTT
D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V
GATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGCGAAGATCGTTTATGTCATAAA
D F L S K L P E M L K M F E D R L C H K
ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTTTGAT
T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D
```

GTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAA
V V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K
AAACGTATTGAAGCTATCCACAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCA
K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A
TGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGAT
W P L Q G W Q A T F G G G D H P P K S D

BamHI

CTGGTTCCGCGTGGATCC

L V P R G S

GGGTTTGAGAGCATAGCATGTTGTGCTGATTCAAATTACACAGATCCAAAAACCACCCTA
G F E S I A C C A D S N Y T D P K T T L
ACTTATACAACAGATCACATCTGTTTCTCTGATAAAAGAAGTTGCAGACAAAATACCCGAA
T Y T T D H I W F S D K R S C R Q I P E
ATTTTGTTTAGCCACAGAAGCAATAAAAATGTTGAAAATTTGAAATATATGAAGGAAAG
I L F S H R S N K N V R K F E I Y E G K
AGATGTTATAATTTGCCAACAGTTAAGGATCAAGTATATTTGATAAGGGGCATATTTCCC
R C Y N L P T V K D Q V Y L I R G I F P
TTTGATAGTTTAAATTCTTCGTTTTATGTTTCGATCGGGTAACAGAACTAGGCGAATTA
F D S L N S S F Y V S I G V T E L G E L
AGATCGTCTAGGCTCGAGGACTTGAAAATTGAGGGAGTTTTTAGAGCCACCAAAGACTAC
R S S R L E D L E I E G V F R A T K D Y
ATAGATTTCTGCTTATTGAAGGAGGATGTCAATCCCTTCAATTTCTCAGATTGAATTGAGG
I D F C L L K E D V N P F I S Q I E L R

Exon2

CCATTACCTGAAGAATACCTACATGGTTTTCGGTACTAGTGTTTTAAAAGTATAAGCAGA
P L P E E Y L H G F G T S V L K L I S R
AACAACTTTGGTGACACAAAATGATGATATAAGTTCCAGATGACCAAAATGATAGAATC
N N L G D T N D D I R F P D D Q N D R I
TGGAAACGGAAAGAACTTCAACTCCAACATCTGCCCTTCCACTGTCTTTCAATGTCAGC
W K R K E T S T P T S A L P L S F N V S
AATGTTGACCTCAAAGACAGTGTACACCTCTCTACAAGTCTCAAAACAGCTTACT
N V D L K D S V T P P L Q V L Q T A L T
CACCTGAGCGATTGGAGTTCGTCATGATGGCCTCGAGACCGATGATTATGAATACTCT
H P E R L E F V H D G L E T D D Y E Y S
GTGTTTCTCCACTTTCTTGAAGTAAATGGCACTGTGAGAGCAGGACAAAGGGTGTGGAC
V F L H F L E L N G T V R A G Q R V F D
ATCTATCTAAACAATGAGATTAAAAAGGAGAAATTTGATGTTTTGGCTGGAGGTCCAAG
I Y L N N E I K K E K F D V L A G G S K
AACAGTTACACTGCCTTGAACATTTAGCAAAATGGATCACTCAATATAACCTTAGTCAAG
N S Y T A L N I S A N G S L N I T L V K

Exon3

PstI

GCATCTGGATCTGAGTTTGGACCCCTTTTGAATGCCTATGAAATCTGCAG

A S G S E F G P L L N A Y E I L Q

EcoRI

CTGGTACCATATGGGAATTCGGGGTGCAGTCTGAGCGGCCGCATCGTACTGACTGACGATCTGCCTCG

L V P Y G N S R V D S S G R I V T D Stop

pTRChis

pGEX-4T-3EcoRI

7. ábra. GST-NORK konstrukció szekvenciája a restriktions helyek jelölésével

Ellenanyagok előállítás

Mindhárom ellenanyag standardimmunizálással nyúlban történt.

Poliklonális ellenanyagok tisztítása

A vérből ammónium szulfátos kicsapással és Protein G affinitás kromatográfiával tisztítottuk az ellenanyagokat.

Tisztított GST-fúziós fehérje elleni poliklonális ellenanyag specificitásának ellenőrzése

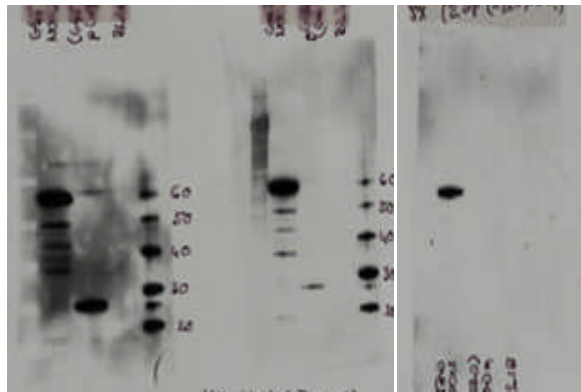
A poliklonális ellenanyagaink a feltételezett NORK fehérje mellett számos egyéb fehérjét is detektálnak a gyökér extraktumban. Kimerítéses módszerrel próbáltuk az azonosítást a NORK-ra kizárni.

Példaként mutatom be a GST fúziós fehérje ellen készült ellenanyag, az alfa NORK specificitását Western blotton. A 8. ábrán bemutatott elektroferogramokat kaptuk a rekombináns baktérium lizátum elválasztott fehérjeire. A Western blotton az előhívás ECL technikával tormaperoxidázzal jelölt anti nyúl másodlagos ellenanyaggal készült. Összehasonlításként kontrol baktérium lizátumokat is láthatunk a GST-NORK konstrukciót hordozó BL21 baktérium (BL21/pGEX/NORK) (1) lizátum mellett: üres BL21 baktérium (3), GST konstrukciót hordozó BL21 baktérium (BL21/pGEX)(2). Látható, hogy a GST-NORK konstrukciót hordozó baktérium lizátumon az ellenanyag a várható GST-NORK fehérje sávon kívül (62 kDa) számos egyéb fehérjét is detektál, amit sikerült kimerítenünk a GST konstrukció lizátumával. A kimerítést az ellenanyaggal történő inkubálásnál különböző arányban az oldathoz adott BL21/pGEX baktérium lizátum hozzáadásával végeztük.

1 2 3

1 2 3

1 2 3



A

B

C

8. ábra. Ellenanyag specificitás ellenőrzése

A: 0 ml BL21/pGEX lizátum + 10 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

B: 1 ml BL21/pGEX lizátum + 9 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

C: 5 ml BL21/pGEX lizátum + 5 ml blokkoló puffer + 5 µl ellenanyag

MW GST: 26 kDa

MW GST +NORK 2+3 exon: 62 kDa

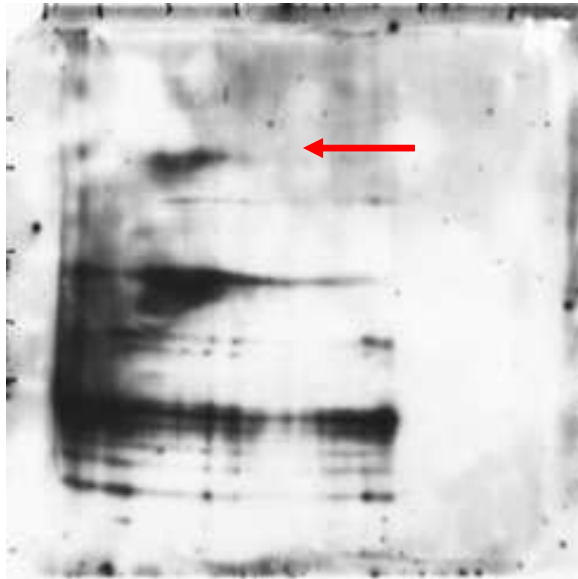
1: BL21/pGEX/NORK 2: BL21/pGEX 3: BL21

Két -dimenziós poliakrilamid gélelektroforézis NORR fehérje analízisére

Miután az ellenanyagok tulajdonságait megismertük, a gyökér extraktumból két-dimenziós elektroforézissel elválasztottuk a fehérjéket és immunblotton azonosítottuk. A 9. és 10. ábrán ugyanaz a blot két különböző ellenanyaggal történő detektálása látható.

pH 4.0 5.0 5.5 6.0 7.0

MW
kDa
97
64
51
39

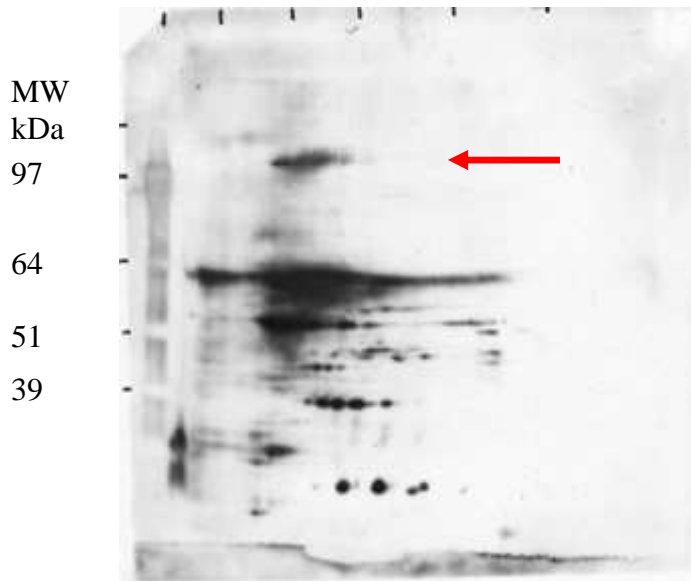


9. **ábra.** NORK fehérje azonosítása 2D gélen α NORK ellenanyaggal.

350 μ g fehérjét választottunk el első dimenzióban pH 3-10 NL IPG gélen, míg második dimenzióban 4-12 % BisTris gélen MOPS SDS rendszerben.

A Western blottot 2000X α NORK elsődleges ellenanyaggal és 50 000X anti nyúl másodlagos ellenanyaggal ECL Plus detektálással hívtuk elő. A NORK-nak megfelelő jelet nyíllal jelzem (MW 100KDa, IP 5, 2)

pH 4.0 5.0 5.5 6.0 7.0



10. ábra. NORK fehérje azonosítása 2D gélen G3 ellenanyaggal.

350 µg fehérjét választottunk el első dimenzióban pH 3-10 NL IPG gélen, míg második dimenzióban 4-12 % BisTris gélen MOPS SDS rendszerben.

A Western blottot 5000X G3 elsődleges ellenanyaggal és 50 000X toma peroxidázzal konjugált anti nyúl másodlagos ellenanyaggal ECL Plus detektálással hívtuk elő.

Ez az ellenanyag is a NORK-nak megfelelő (MW 100KDa, IP 5, 2) jelet adta. Látható a 9. és 10. ábra összehasonlításából, hogy a többi, ellenanyag által detektált fehérje nem egyezik meg.

Mivel a lucerna gyökérből nem tudtunk eddig olyan mennyiségben előállítani fehérjét, hogy N-terminális szekvenálással, vagy MALDI analízissel azonosítani tudjuk, ezért nagyobb mennyiségű fehérje előállítását tranziens expresszióval dohánylevélben végeztünk, amiből aztán immunprecipitációval próbáltunk fehérjét kinyerni.

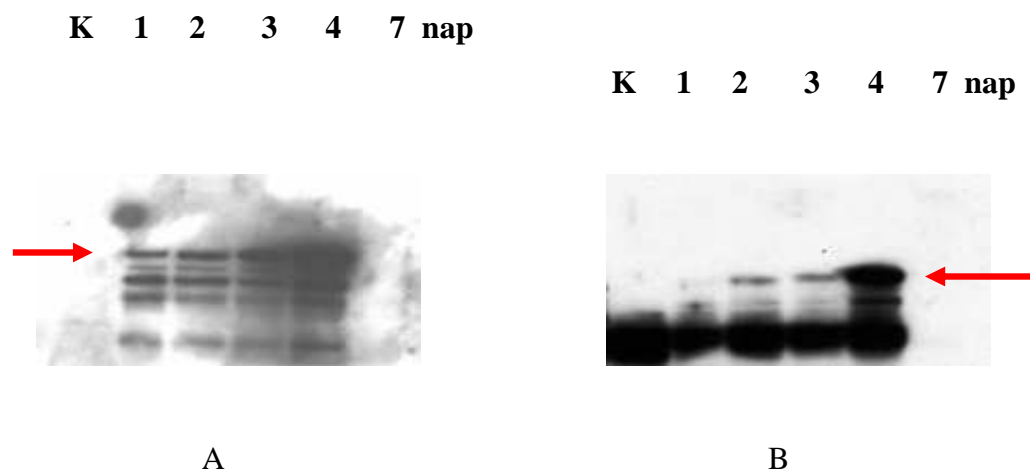
NORK fehérje termeltetés tranziens expresszióval dohánylevélben *Agrobacterium tumefaciens* segítségével

Agrobacterium tumefaciens infiltrálással a következő rekombináns fehérjéket termelő génkonstrukciókat juttattunk be a dohánylevélbe:

1. *Agrobacterium* konjugátum készítése NORK ill. epitop jelzett NORK fehérjével
 - a. C53C1 *Agrobacterium tumefaciens* törzs
 - b. pBin 61S NORK, pBin 61S-NORK-c-myc, pBin 61S NORK-HA vektor konstrukciók, *E.coli*
 - c. pRK helper plazmid, *E.coli*
2. *Agrobacterium* konjugátum készítése P14 szupresszor fehérjével a fent leírt módon.

Az infiltrált dohánylevél SDS-feltáró pufferrel készített fehérje extraktumából sikerült kimutatni a NORK fehérjét Western bloton NORK fehérje elleni (G3, alfa NORK) ill. az epitoppal jelölt konstrukciók esetén a megfelelő tag elleni (anti-c-myc, anti -HA) ellenanyagokkal is (11. ábra.).

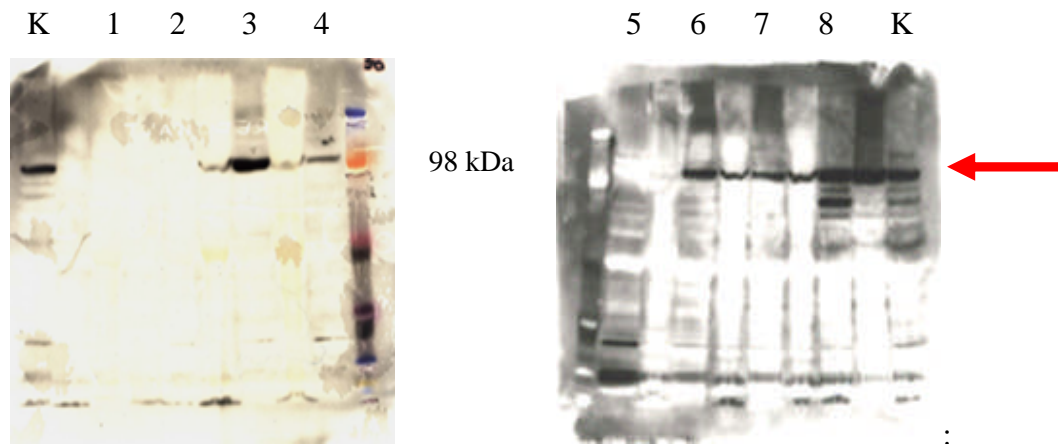
Látható a kinetikából, hogy az infiltrálást követő 4. napon kaptuk a legintenzívebb expressziót.



11. ábra. Tranziensen expresszált NORK fehérje kinetika anti c-myc (A) és G3 (B) ellenanyagokkal történt detektálással.

Kísérletek rekombináns NORK fehérje izolálására immunprecipitációval dohánylevélből

Miután sikerült tranziens expresszióval dohánylevélben rekombináns NORK fehérjét és c-myc epitoppal jelölt változatát is termeltetnünk, a fehérjét dohánylevél extraktumból immunprecipitációval próbáltuk kinyerni anti –NORK (G3) ill. anti –c-myc ellenanyagokkal. Mivel SDS feltáró pufferben nem tudunk immunprecipitációt végezni, először a megfelelő detergenst tartalmazó feltárás körülményeit kellett optimalizálnunk.



12. ábra. Különböző detergenst tartalmazó feltáró puffer rendszer tesztelése Western blotton c-myc epitoppal jelzett NORK fehérjén. Az 5. számú feltáró pufferhez adtuk a különböző detergenst a következő mennyiségben:

1: 2% ASB-16, 0,1 % SDS; **2:** 0,5% OG, 0,1 % SDS; **3,7:** 4% CHAPS, 0,1 % SDS;

4: 1% C7BzO, 0,1 % SDS; **5:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS/HCl pH:8,0; **6:** 4% CHAPS

8: 2% SDS

Az eredmények alapján a továbbiakban csak a 4% CHAPS (6) detergenst tartalmazó feltáró puffert használtuk az immunprecipitáció során a következő kísérleti körülményeket alkalmazva:

1. *Agrobacterium tumefaciens* segítségével NORK (A) ill. NORK-c-myc (B) fehérjét termeltünk tranziens expresszióval dohánylevélben.

2. Az infiltrált levélből 4 % CHAPS detergenst és proteináz inhibitor koktélt tartalmazó lízis pufferben feltártuk a sejteket.

Adott ideig tartó szonikálás (10 ciklus: 5 sec on /3 sec off) és jégen történt 40 min inkubálás után lecentrifugáltuk a mintát.

3. Az endogén immunglobulinok eltávolítása céljából a felülúszóhoz lízis pufferrel egyensúlyba hozott Protein G agarózt adtunk. A Protein G fehérje különböző immunglobulinok konstans Fc régiójához kötődik.

Inkubálás után (4 °C, 1h) a mintát lecentrifugáltuk.

4. A tiszta felülúszóhoz G3 poliklonális (A) ill. a (B) esetben anti c-myc monoklonális ellenanyagot adtunk. Az ellenanyag variábilis része, Fv felismeri az antigéneket és hozzákötődik, immunprecipitáció történik.

5. Inkubálás (4 °C, 1h) után ismét Protein G agarózt adtunk a rendszerhez, és 4 °C-n további 1h keresztül inkubáltuk. A Protein G felismeri az előbbi ellenanyagok Fc régióját és hozzákötődik. Ezzel a lizátumból kikötjük az ellenanyagot a hozzákapcsolódott antigén fehérjével (A: NORK ill. B: NORK c-myc) együtt.

6. Az agaróz gyöngyöket centrifugálással összegyűjtöttük és lízis pufferrel alaposan átmostuk.

7. SDS minta előkészítő pufferrel eluáltuk az antigént.

8. SDS gélelektroforézissel elválasztottuk a fehérjéket.

9. Western blottot készítettünk.

10. Immundetektálással azonosítottuk az eluált antigéneket: A: NORK) ill. B: NORK-c-myc.

Jelenleg nagyobb mennyiségben próbálunk dohánylevélből fehérjét izolálni. Amennyiben sikerül az eddig csak immunológiailag detektált fehérjét megszekvenálni, akkor ezek alapján a fehérjét a lucerna gyökérből is azonosítani tudjuk.

Kísérletek folynak továbbá a NORK partner fehérjék keresésére élesztő két-hibrid rendszer segítségével (LYK3, NFP) .

Az eddigi eredményekből jelenleg készülő publikációt szeretnénk később bejelenteni.

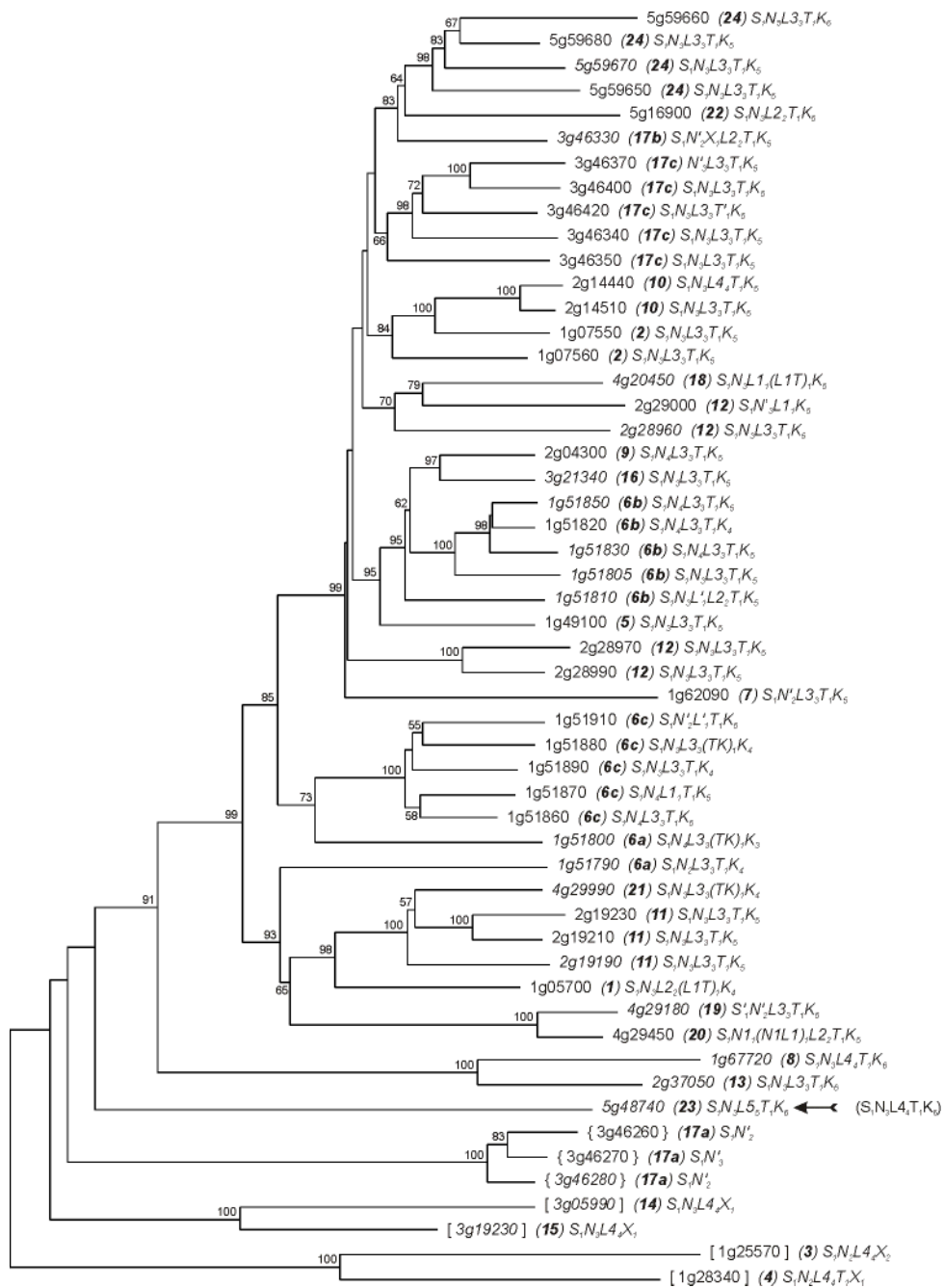
Filogenetikai elemzések

A NORK vagy SYMRK fehérje (nodulation receptor kinase vagy symbiosis receptor kinase) extracelluláris régiójának (NORKE) nagy részét alkotó, a szignál peptid és az LRR-ek között elhelyezkedő doménhez hasonló szekvencia (NORKE sequence like domén., NSL) számos növényi receptor-szerű kinázban (receptor like kinase, RLK) megtalálható. Az NSL domén valamint a 2-5 LRR (leucine-rich repeat) jelenléte az RLK fehérjék LRR1 csoportjára jellemző.

Filogenetikai elemzéseket végeztünk annak megállapítására, hogy a pillangósvirágú növényekben található NORK/SYMRK fehérjék az LRR1 családon belül milyen evolúciós pozíciót foglalnak el, és a teljes géncsalád evolúciójában milyen mechanizmusok játszhattak szerepet. Arra is választ kerestünk, hogy a NORK/SYMRK gén homológjai megtalálhatók-e szimbiotikus nitrogénkötésre nem képes növények genomjában is.

Az LRR1 fehérjecsalád génjeinek részletes *in silico* elemzését elvégeztük az *Arabidopsis thaliana* genomban, az elsőként rendelkezésre álló és máig legjobban annotált növényi genomszekvenciában. Az *A. thaliana* teljes genomi szekvenciájában megkerestük az összes olyan gént, amelyek feltételezett fehérjeterméke az NSL szekvenciát is tartalmazza. Az NCBI adatbázisában megtalálható – elsősorban számítógépes génelőrejelzésen alapuló – *Arabidopsis* genomannotáció e gének jelentős részénél ellenőrzésre és javításra szorult. Az 53 azonosított gén közül négy bizonyítottan pszeudogén: a kérdéses régió szekvenciájának ellenőrzése megerősítette a kereteltolódási ill. korai terminációt okozó mutáció jelenlétét. A 49 feltételezett aktív gén többsége a NORK fehérjével rokon – az LRR1 csoportba tartozó – receptor típusú kinázt kódol. Négy fehérje nem rendelkezik kináz doménnel, további hátról pedig a transzmembrán régió is hiányzik. A multigén-család tagjai az öt *Arabidopsis* kromoszómán elszórtan helyezkednek el, egyedileg illetve több közel rokon gént egymás mellett tartalmazó klaszterekben.

Megvizsgáltuk az *Arabidopsis* NSL fehérjék filogenetikai kapcsolatait mind az NSL régió, mind a kináz domén szekvenciája alapján. Itt csak az NSL szekvenciák alapján készült fát mutatjuk be (13. ábra). A két filogenetikai fa jó összhangban van egymással, ami az NSL és a kináz domén koevolúciójára utal a géncsaládon belül. A leucin-gazdag ismétlődések (LRR) száma többnyire három, de hat fehérje négy LRR-t, egy pedig öt LRR-t tartalmaz. Mivel az egyes LRR-eket kódoló exonokat azonos fázisú intronok választják el egymástól, a régiót érintő egyenlőtlen crossing over az LRR-ek számának megváltozását vonja maga után.

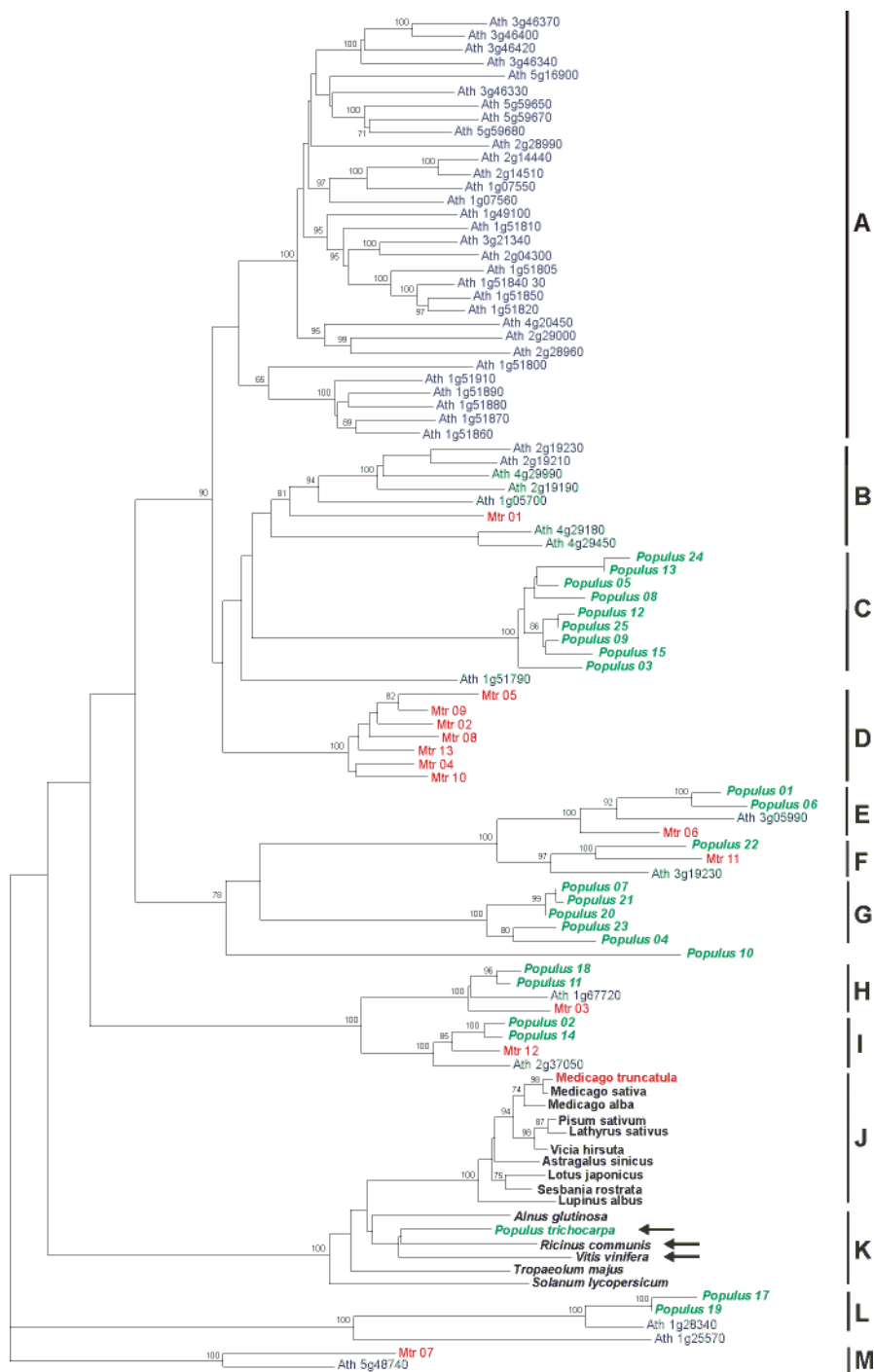


13. ábra. 53 prediktált paralóg *Arabidopsis* gén által kódolt LRR1 RLK fehérje filogenetikai kapcsolatai az NSL domén alapján. A fehérjéket a gének szokásos kódjával jelöltük, ahol a „g” betű előtt a kromoszóma száma, utána a gén száma áll. A filogenetikai fát a PHYLIP programcsomag *protDist* és *fitch* programjaival készítettük (Felsenstein, 2005). A távolságmátrix számításához a JTT aminosav-helyettesítési modellt használtuk (Jones és mti., 1992), a fa topológiáját és az ághosszakait a Fitch-Margoliash módszerrel becsültük. A gyökér nélküli fát a *retree* programmal, középpontos módszerrel alakítottuk a fenti formára. A vizualizáláshoz a *drawgram* programot használtuk. Az 1000 véletlen mintavételezéssel végzett bootstrap analízishez a fentiekén kívül felhasználtuk a *seqboot* programot is. Az 50 % feletti bootstrap értékeket tüntettük fel az ábrán. Dőlt betűvel szedtük az EST konszenzus szekvenciával alátámasztott, kifejeződő gének azonosítóját. Szögletes illetve kapcsos zárójellel jeleztük azokat a feltételezett fehérjéket, melyek nem tartalmazzák a kináz domént illetve az LRR szekvenciákat sem. Zárójelben vastagított számmal jelöltük a génklasztert, ahol kis betű jelzi a pozicionális és filogenetikai információk alapján megállapított szubklasztert. A fehérje doménszerkezetét leíró kódban nagy betűvel a domének jele és száma, alsó indexben az exonok száma olvasható (S: szignál peptid, N: NSL domén, L: LRR, T: transzmembrán hélix, K: kináz domén, X: ismeretlen, a családban nem konzervált szekvencia). A nyíl a NORK/SYMRK fehérjéhez leginkább hasonlító *Arabidopsis* fehérjére mutat (zárójelben a NORK fehérje doménstruktúrája).

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az LRR1 fehérjét kódoló géncsalád amplifikációja több lépésben, hosszabb evolúciós időszakokon átívelően zajlott le. Szerepet játszhatott benne az *Arabidopsis* genom akár többszöri duplikálódása, aminek nyomai szegmentális duplikációk formájában mutathatók ki a genomban (Vision és mti., 2000). A klasztereken belüli viszonylag friss duplikációk valószínűleg egyenlőtlen crossing over események során jöttek létre.

A nyárfa (*Populus trichocarpa*) teljes genomszekvenciájában valamint a *Medicago truncatula* genom eddig meghatározott szekvenciájában prediktált fehérjekódoló gének közül megkerestük azokat, amelyek az LRR1 családba tartozó, NSL-doménnel rendelkező fehérjét kódolnak, és rokonsági kapcsolataikat az *Arabidopsis* LRR1 fehérjével közös filogenetikai fán ábrázoltuk (14. ábra). A nyárfa genomban 25 homológ gént találtunk. Kimutattuk, hogy közülük egy a NORK gén ortológja, ami a VII-es kapcsoltsági csoportban (LG VII), a *M. truncatula* NORK génjével szintenikus régióban helyezkedik el (Kevei és mti., 2005). A szekvenálás alatt álló ricinus (*Ricinus communis*) és szőlő (*Vitis vinifera*) genomban szintén azonosítani tudtuk a NORK homológját (14. ábrán nyíllal jelölve). A homológiát bizonyítja, hogy a filogenetikai fán az ismert NORK/SYMRK fehérjékkel és homológjaikkal azonos csoportba klasztereződnek (14. ábra, J és K csoport együtt). Ez a csoport a fa többi ágától jelentősen elkülönülve alkot egy 100 % bootstrap értékkel támogatott monofiletikus csoportot. Mindez arra utal, hogy ez a fehérje az LRR1 családon belül egy ősi leszármazási ágat képvisel, ami korán divergálódott az LRR1 család többi tagjától. Génjét eddig csak egy kópiában sikerült kimutatni azokban a fajokban, ahol megtalálták. E fajok között több olyan van, ami nem vesz részt gümőképzéssel járó szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolatban. Ezekben a növényekben (14. ábra, K csoport) a NORK/SYMRK fehérje rokonai valószínűleg az arbuskuláris mikorrhizát (AM) alkotó gombákkal való szimbiózisban vesznek részt (Zhu és mti., 2006). Ugyanakkor, *Arabidopsis*-ban nem található meg a NORK/SYMRK homológja, még a szintenikus régiókban sem (Kevei és mti., 2005; Zhu és mti., 2005), tehát vagy a foszfátfelvételben szerepet játszó AM szimbiózis nem általános, vagy a NORK/SYMRK-val homológ fehérje nélkülözhető a folyamatban.

A *Medicago truncatula*-ban eddig 14, az LRR1 családba tartozó fehérje génjét sikerült azonosítani. A *M. truncatula* eukromatikus genomszekvenciájának azonban még csak kb. 2/3-a ismert, ezért a szekvencia-meghatározás előrehaladtával a család további tagjainak kimutatása várható.



14. ábra. A NORK/SYMRK fehérje és homológjai monofiletikus csoportot alkotnak az LRR1 RLK fehérjecsaládon belül. A filogenetikai fa genomai szekvenciákból prediktált LRR1 fehérjéket (*Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* és *Medicago truncatula*) valamint a NORK/SYMRK fehérjék ismert homológjait (a UniProt adatbázisból) illetve két szekvenálás alatt álló genomból (*Ricinus communis* és *Vitis vinifera*) általunk prediktált homológjait tartalmazza (utóbbiak és a *Populus*-ban található NORK ortológ nyíljal jelölve). Az *Arabidopsis* (Ath, kék színű) fehérjéket a gének szokásos kódjával jelöltük (a pszeudogéneket elhagytuk). A nyárfa (*Populus*, zöld színű) és *Medicago truncatula* (Mtr, piros színű) fehérjék számozása önkényes. A NORK/SYMRK homológokat (J és K csoport) a teljes fajnévvel és vastag betűvel tüntettük fel, dőlt betűvel szedve a szimbiotikus nitrogénkötéssel nem rendelkező fajokat (K csoport). A filogenetikai fát az NSL domén szekvenciája alapján, az 1. ábránál leírt módon készítettük, azzal a különbséggel, hogy a fa topológiáját és az ághosszakat a „neighbor-joining” módszerrel becsültük (neighbor program), a bootstrap analízist pedig 500 mintával végeztük. Az ábrán a 70 % feletti bootstrap értékeket tüntettük fel.

Az LRR1 fehérjecs család filogenetikai kapcsolatait szemlélve látható, hogy a család egyes tagjai kis kópiaszámban, de több – gyakran mindhárom – fajban megtalálhatók (14. ábra; E, F, H, I, L és M csoportok). Ezek valószínűleg konzervált funkciójú, kis evolúciós flexibilitást megengedő fehérjék. Más LRR1 RLK fehérjék az egyik fajban nagymértékben amplifikálódtak, számos paralógot eredményezve, míg a másik két fajban többnyire nem találtunk közeli rokonokat. Mindhárom fajban ki tudtuk mutatni ilyen szelektíven felszaporodó paralógok monofiletikus csoportjait (*A. thaliana*: A és B csoportok; *P. trichocarpa*: C és G csoportok; *M. truncatula*: D csoport; 14. ábra). Az ilyen közeli rokon paralógok biztosíthatják az evolúció nyersanyagát ahhoz, hogy a géncsalád negatív szelekciós nyomás alól felszabaduló tagjai új vagy módosult funkciót vehessenek fel.

Irodalom

Cullimore, J., Denarié, J. (2003) How legumes select their sweet talking symbionts. *Science* **302 (5645)**: 575-580.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417(6892)**: 962-968.

Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 275-282.

Kevei, Z., Seres, A., Kereszt, A., Kaló, P., Kiss, P., Tóth, G., Endre, G., Kiss, G.B. (2005) Significant microsynteny with new evolutionary highlights is detected between *Arabidopsis* and legume model plants despite the lack of macrosynteny. *Mol. Genet. Genomics* **274**: 644-657.

Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., Geurts, R. (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102(29)**: 10375-10380.

Vision, T.J., Brown, D.G., Tanksley, S.D. (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* **290**: 2114-2117.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., Shoemaker, R.C. (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* **137**: 1189-1196.

Zhu, H., Riely, B.K., Burns, N.J., Ane, J.M. (2006) Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics* **172**: 2491-2499.