

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**Bakteriofág és bakteriális represszor vizsgálata *in vivo*
és *in vitro* módszerekkel**

Doktori értekezés tézisei

Ferenczi Szilamér Imre

**Gödöllő
2008**

A doktori iskola

megnevezése: Biológia Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia Tudományok

vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezetők: Dr. Orosz László
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
ELTE Természettudományi Kar

Dr. Papp Péter
tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Iskolavezető jóváhagyása:

.....

Dr. Tuba Zoltán

Témavezetők jóváhagyása:

.....

Dr. Orosz László

.....

Dr. Papp Péter

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

A dolgozat látszólag két eltérő rendszer vizsgálatából épül fel, melyek között a közös kapcsolódási pont, hogy DNS-fehérje interakciós vizsgálatokat használtunk a génszabályozási funkció és a molekuláris szintű szerkezetek tisztázásához. Mindezen elemeket olyan részletességgel vizsgáltuk, hogy elkészíthessünk egy működési modellt, illetve a *16-3* fág represszor esetében egy már meglévő modellt kiegészíthessünk.

A *16-3* fág életciklusát szabályozó C represszor fehérje a fág jobb illetve bal oldali operátorain keresztül (O_R és O_L) befolyásolja a különféle bakteriofág gének transzkripcióját. Mindkét operátor régióban két represszor kötőhely található, az O_L operátorok azonban 12 bp míg az O_R operátorok 14 bp hosszúak. Az operátorok felépítése eltérő, de funkcionálisan mégis azonos értékűnek tekinthetők. A bakteriofágok körében csak néhány olyan represszor fehérje ismert, ami képes eltérő szerkezetű operátorok hatékony felismerésére. Ilyen például az *E. coli* ciklikus AMP receptor proteinje (CRP), mely két eltérő hosszúságú operátort ismer fel. A 16 és 18 bp hosszú operátorokat 6 illetve 8 bp centrális spacer választja el egymástól. A DNS-fehérje kapcsolódás során a CRP a kötés kialakulásakor konformáció változást indukál az operátoron. A DNS szerkezete B DNS-ből A-DNS formába alakul át, így lehetővé teszi a hosszabb operátor felismerését is anélkül, hogy a „spacer” régióval kialakítana specifikus kapcsolatot a cAMP-CRP komplex. A másik nagyon érdekes represszor a CytR, mely két oktamer ismétlődő szekvenciát ismer fel direkt vagy ellentétes orientációban 2 bp elválasztó résszel szeparálva. A cAMP-CRP komplex jelenlétében a CytR represszor képes felismerni ellentétes orientációban a kötőhelyeit 10-13 bp résszel elválasztva, illetve direkt ismétlődő elrendezésben 1 bázissal szeparálva. Az eltérő kötőhelyek felismerését ebben az esetben a cAMP-CRP komplex által a CytR represszoron indukált, fehérje-fehérje kölcsönhatásból eredő konformációváltozás teszi lehetővé. Különleges tulajdonságot mutat az operátor felismerésben az *E. coli* 186 bakteriofág CI represszora, mely két féle operátorhoz tud kötődni. Az A és B típusnak nevezett operátorok közül az A variáns félkötőhelyei 4 illetve 5 bp elválasztó résszel rendelkeznek. A két eltérő operátor kötésében a represszor felismerő hélix eltérő aminosav oldalláncai vesznek részt. A *16-3* C represszor esetében nem kimutatott más faktor jelenléte a represszor fehérje-operátor komplex kialakulása során és az operátor DNS szerkezete nem valószínűsíti a szerkezeti változásokat sem.

Kísérleteink során célunk annak tanulmányozása volt, hogy a *16-3* C represszor és eltérő operátorai hogyan képesek egymással hatékony komplexet alkotni. A jelenség pontosabb megértésének érdekében egyrészt egy kópiás *in vivo* riporter rendszereket állítottunk elő, melyekkel vizsgáltuk a *16-3* fág eredetű vad és aminosavcserét tartalmazó mutáns C represszor fehérjék kölcsönhatását vad és mutáns operátoraikkal. Célunk ezzel egy olyan szupressziós fenotípust, megváltozott specificitást adó mutáns represszor izolálása, mely a DNS-fehérje komplex kialakulásának pontosabb megértéséhez közelebb visz minket. Ezekkel a kísérletekkel a represszor és operátorainak dokkolási mintázatát vizsgálhatjuk, vagyis hogy a két vad operátoron (O_{R2} és O_{L2}) a dokkolási felületben létezik-e eltérés.

A modern biológiában a fágok nem pusztán a molekuláris biológiai folyamatok megértésének alanyai, hanem többek között a modern biotechnológia eszköztára is jelentősen bővült a fágokból izolált „molekuláris eszközök” felhasználása révén. A bakteriofágok irodalmának tanulmányozása során találtunk rá a *P1* fág stabilitási faktoraként használt addikciós rendszerre, mely végső soron felkeltette az érdeklődésünket a TA rendszerek iránt.

Adatbázisból kiindulva egy az *E. coli pemIK* addikciós modulhoz nagy hasonlóságot mutató operon került a látóterünkbe. Ezek az egy antitoxinból és egy toxinból álló kétkomponensű addikciós rendszerek általában a Gram- eubaktériumok körében fordulnak elő nagy számban. Az ebbe a családba tartozó addikciós modulok a legjobban tanulmányozottak. Legismertebbek az R1 és R100 replikonnal rendelkező plazmidok stabilitási komplexei, mint a *kis/kid* (killing suppressor és killing determinant) és a *pemIK* (plasmid emergency maintenance), és ezek kromoszómális homológjai, *chpA* és *chpB* (chromosomal homologues of pem) lókuszek klasszikus TA elrendeződést mutatnak. A *chpA* lókuszt legújabbban *mazEF* néven ismertetik. A *mazF* toxin a bakteriális programozott

sejthalál folyamataiban is részt vesz, többek között a sejt energiaháztartásában esszenciális *mazG* és *era* génekről képződő mRNS-ek szekvencia specifikus hasításán keresztül fejt ki citotoxikus hatását. A *pemIK* és *kis/kid* rendszerek szintén képesek mRNS szekvencia specifikus hasítására, de nem feltétlenül pusztítják el a sejtet, ellenben jelentősen csökkentik a plazmidmentes utógeneráció növekedését. A PemK toxin nem igényli a riboszóma jelenlétét az mRNS hasítása során. A tisztított MazF fehérje az ACA helyen hasítja az mRNS-t. A hasítás fiziológias körülmények között nagyobb valószínűséggel történik a kódoló régióban, ami a riboszómák befolyásoló szerepét is valószínűsíti a vágási folyamatban. A MazEF hatásmechanizmusában részt vesz egy pentapeptid (NNWNN), mely kikerülve az extracelluláris térbe a szomszédos sejtekben TA modul aktivációt okozva, nem direkt hatva a toxin-antitoxin alegységre, a sejtek pusztulását okozza. A tisztított peptid (extracellular death factor, EDF) az *E. coli* sejtenyészethez adva önmagában is jelentős CFU csökkentő hatással bír.

Gyakorlati felhasználhatósága miatt az *A. tumefaciens* genomikusan kódolt *pemIK* ortológ toxin-antitoxin (TA) rendszer operonjának finom molekuláris architektúrájának és funkciójának tanulmányozását tűztük célul. Vizsgálatainkkal továbbá a promóter régiót, az operátort és regulációs viszonyainak azonosítását szándékoztuk elvégezni. A fehérjék interakciójáról nyerhető információkat kiegészítettük fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására alkalmas keresztkötési eljárásokkal is. Végző soron pedig tanulmányozni kívántuk, hogy milyen hatása van a PemK toxin fehérjének a sejtek növekedésére.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Élő anyagok és mikrobiológiai technikák

A plazmid konstrukciók építése során és a konjugációs kísérletekben a plazmidok donorjaként az *E. coli* DH5 α törzset használtuk. A fehérje expressziós és tisztítási eljárásokhoz az *E. coli* BL21(DE3) pLys3 törzset használtuk. A 16-3 fág kísérletekben és a konjugációban recipiensként a *R. meliloti* 41 és *A. tumefaciens* C58 törzseit használtuk. A 16-3 fág technikákat (szaporítási feltételek, profág indukció) a szakirodalomban leírt eljárások alapján hajtottuk végre. Az *in vivo* mérőrendszerek előállításához *E. coli* DH5 α törzsben λ RS45 fágtörzset használtunk.

2.2. Molekuláris biológiai eljárások

Nukleinsavak izolálásában és manipulációjában (DNS tisztítás, restrikciós endonukleázokkal történő hasítás, elektroforetikus elválasztás, DNS fragmentek és szintetikus oligonukleotidok plazmid vektorba építése, polimeráz láncreakció (PCR), DNS nukleotidsorrend meghatározása, transzkripciós starthely azonosítása (primer extension), β -Galaktozidáz aktivitás mérése), a fehérje munkák (fehérje túltermeltetés, His-Tag toldalékolt fehérjék tisztítása, elektroforetikus elválasztás (SDS-PAGE)) során, valamint a gél retardációs kísérletek (EMSA) és footprint kísérletben a molekuláris biológiában általánosan használt, valamint a gyártó cégek által javasolt eljárásokat követtük.

3. EREDMÉNYEK

3.1. 16-3 fág C represszor

3.1.1. Egy kópiás *in vivo* mérőegység előállítása

A gazdasejtben történő *in vivo* vizsgálatokhoz előállítottunk egy a 16-3 fág helyspecifikus rekombinációs rendszerét hordozó integratív plazmid vektort, mely *lacZ* riportergént tartalmaz. Ez a mérőegység lehetővé teszi a precíz összehasonlításokat és modellezi a profág stádiumot

3.1.2. pGSB1 vektor tesztelése a 16-3 fág C represszor fehérje és a vad típusú operátorainak *in vivo* vizsgálatára

A C represszort transz helyzetből, plazmidról, nagy moláris túlsúlyban termeltettük és *lacZ* riportergéne keresztül mértük a represszió értékeket a két vad típusú operátoron (O_{L2} és O_{R2}). A mérések alapján megállapíthatjuk, hogy a két vizsgált vad típusú operátor (O_{L2} és O_{R2}) mindkét fajban szinte azonos represszió értékeket adott. Az eredmények alapján, tehát a konstruált mérőegység alkalmas a 16-3 bakteriofág C represszorának és operátorainak tanulmányozására a gazdaszervezetben.

3.1.3. A C represszor felismerő hélix aminosav oldalláncainak fontossága az operátorokkal kialakított kölcsönhatás során (alanin scanning)

Azért, hogy meghatározzuk a felismerő hélix egyes aminosavainak részvételét az operátor felismerésében és kötésében, előállítottunk egy olyan kísérleti rendszert, mely alkalmas aminosavcserék generálására az általunk vizsgálni kívánt felismerő hélixet is tartalmazó represszor régióban. A továbbiakban annak eldöntésére, hogy az adott pozícióban jelen levő aminosavak oldalláncai az operátoron történő dokkolásban és kötésben szerepet játszanak-e, nagyon rövid oldalláccal rendelkező alaninra cseréltük le a Q37, Q38, I40, N41, N42 és I43 aminosavakat. A *lacZ* riportergéne keresztül meghatároztuk a represszió mértékét az O_{L2} és O_{R2} operátorokon az alanin cserés represszoroknak. A legnagyobb funkciókiesést a C^{Q37} pozíció, a legkisebb hatású mutációt pedig a C^{L43} aminosavak alanin cseréje okozta. A két operátor viselkedése nem mutatott jelentős eltérést az alanin csere hatására.

3.1.4. Operátor mutánsok előállítása

Megváltozott specifitású represszor izolálásához szükséges olyan mutáns operátorok előállítása, melyen a vad represszor alacsony R értéket ad (funkcióvesztés) viszont a mutáns represszor a vad típusú represszornak vad operátorhoz közeli represszióval, funkcióval, rendelkezik. A továbbiakban a pGSB1 plazmidba szintetikus oligonukleotidok felhasználásával olyan mutáns operátorokat építettünk, melyek szimmetrikus mutációkat hordoztak minden pozícióban, ami a kötés szempontjából fontos lehet. A szimmetrikus mutációt tartalmazó operátorokon vad represszonnal kapott mérési eredményekből láthatjuk, hogy a leginkább lecsökkent R értékeket, legjelentősebb funkcióvesztés, a 2-2 mutáns operátorok és az 1-1 mutánsok csoportjaiból kerültek ki.

3.1.5. Megváltozott specifitású represszor vizsgálata vad és mutáns O_{R2} operátorokon

A represszor fehérje aminosavcseréit pozicionálisan degenerált szintetikus oligonukleotidok felhasználásával végeztük. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy sikeresen izoláltunk egy megváltozott specifitású C^{Q37Ala} represszort, mely képes volt a vad represszonnal szemben funkcióvesztett $O_{R2}^{1-1/cg}$ mutációt igen nagy hatékonysággal szupresszálni.

3.1.6. Megváltozott specifitású mutáns represszor viselkedése O_{L2} típusú operátoron

Ha a represszor–DNS kölcsönhatás során azonos aminosav oldalláncok és nukleotidok vesznek részt, akkor a rövidebb operátor $O_{R2}^{1-1/cg}$ operátorral megegyező mutációját is képes szupresszálni a megváltozott specifitású alanin cserés represszor. Ennek megvizsgálására létrehoztunk egy $O_{L2}^{1-1/cg}$ operátort tartalmazó konstrukciót szintetikus oligonukleotid primerek felhasználásával, mely az

O_{L2} típusú operátoron is alkalmas a megváltozott specificitású represszor vizsgálatára. A mérések eredményei alapján a megváltozott specificitású C^{Q37Ala} represszor nem volt képes szupresszálni a O_{L2}^{1-1/cg} mutáns operátort.

3.2. A. *tumefaciens* C58 addíciós modul

3.2.1. Promóter régió és transzkripció starthely azonosítása

Tth polimeráz felhasználásával végzett primer extenzióval meghatároztuk a transzkripció starthelyét. A kapott eredmények szerint három lehetséges startpontról indulhat a transzkripció, melyek közül a legerőteljesebb a *pemI* cisztron translációs startponttól -22 nukleotidnyira található citozin. A *pemK* régiótól 5' irányban nem találtunk belső promotert. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a két fehérje transzkripcióját a *pemI* cisztront 5' irányban megelőző promotér egység végzi.

3.2.2. A toxin -antitoxin kapcsolódásának és az operátorával történő interakciójának kimutatása

Olyan kísérleti rendszereket alakítottunk ki, melyek alkalmasak a TA modulok fehérje szintű kapcsolatainak kimutatására, továbbá a lehetséges operátorokkal kialakított interakciók vizsgálatára. Az előállított vektorokról arabinóz indukcióval *E. coliban* tudunk induktív módon expresszálni PemI és PemK proteineket együtt, illetve antitoxin (PemI) és toxin (PemK) fehérjéket külön-külön. A promotér részről egy-kópiás mérőegységet konstruálnunk. Az eredmények szerint, ha csak a PemI és PemK fehérjéket indukáljuk a promotér-operátor-*lacZ* fúziós riportter egységgel szemben, nem tapasztalunk promotér aktivitásbeli csökkenést. Ha a két fehérjét koexpresszióra alkalmas felállásban vizsgáljuk, akkor viszont 48%-ra esik le a relatív promotér aktivitás az arabinóz indukció után, a riportergén transzkripciójának csökkenése miatt. Ez azt jelenti, hogy van operátor a promotert is tartalmazó inszerten, de az csak mindkét protein együttes jelenléte mellett represszálni. Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a TA fehérjék komplexet alkotnak *in vivo* az operátorral és így biztosítják autoregulációjukat.

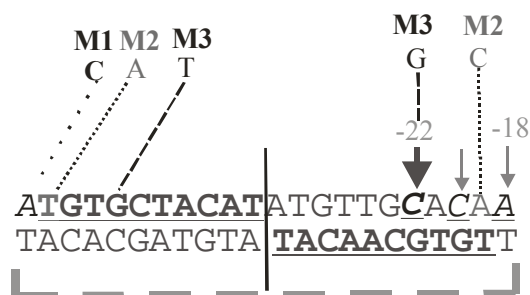
3.2.3. TA fehérje-komplex alkotásának jellemzése

A rekombináns toxin és antitoxin fehérjéket a Ni-NTA oszlopon tisztítottuk. Az SDS-PAGE alapján a koexpresszált TA fehérjék együtt is megjelennek a gélen annak ellenére, hogy csak a PemK toxin volt His-Tag jelölt. A Ni-NTA oszlopon kötődő PemK_{His} rekombináns fehérje képes volt kötni a natív PemI antitoxint és az eluálással mindkét fehérje együtt távozott, ami bizonyítja a fehérje-fehérje kapcsolatok létrejöttét *in vitro* körülmények között.

Annak eldöntésére, hogy milyen moláris arányban vannak jelen a fehérjék operátor jelenléte nélkül a TA komplexben, glutáraldehid keresztkötési kísérletet végeztünk. A glutáraldehid kezelés hatására a reakcióban megjelenő 25 kDa körüli termék szerint a PemI és PemK fehérjék 1:1 arányban, heterodimerként, vannak jelen a citoplazmában jelen levő szabad komplexben.

3.2.4. PemIK fehérjék interakció vizsgálata az operátor régióval, operátor azonosítása

Az operátor pontos azonosítására *in vitro* footprint és *in vivo*, mutációkkal módosított operátorok és TA fehérjék interakciójának *lacZ* riportterrendszerrel történő meghatározását végeztük. A DN-áz I protekciós és hidroxil-gyök interferencia kísérletek kijelölnek egy 20 bp hosszú részleges palindrom régiót. Csak egy bázisnyi eltérés található, melynek pont a közepén van a szimmetriatengelye és így 10-10 bp hosszú két félkötőhelyet tartalmazó elrendezést feltételezhetünk az operátor szerkezetét illetően. Annak eldöntésére, hogy ténylegesen hol is van az operátor határa, olyan mutánsokat terveztünk, melyek *in vivo lacZ* riportergéneken keresztül alkalmasak a kérdés tisztázására. A vad operátorhoz képest az M1 mutáció bevezetése nem csökkentette a szabályozó egység működésének hatékonyságát. Az M2 mutáció mintegy felére csökkentette, az M3 pedig gyakorlatilag teljesen megszüntette a TA komplex represszió képességét az operátoron.



1. ábra: A *pemIK* operátor mutációi

3.2.5. A *pemIK* fiziológiás szerepe

Ennek tanulmányozására a natív toxin, antitoxin és a két fehérje együttes expressziójára alkalmas kísérleti rendszert dolgoztunk ki. A kísérletek szerint a csak antitoxint termelő plazmidot tartalmazó törzs az indukciót követően a kontrollal együtt normális növekedést mutatott. A toxint (PemK) túltermelő vektort tartalmazó törzs növekedése drámaian csökkent. Ezt az erősen gátló hatást a sejtek növekedésére az antitoxin jelenléte kompenzálni tudta. A natív PemK toxin erőteljes expressziója tehát jelentősen csökkentette a sejtek növekedését.

3.3. Új tudományos eredmények

A doktori értekezés alapjául szolgáló kutatómunka eredményeiként az alábbi új tudományos megállapítások születtek:

- 1- Előállítottunk olyan egy-kópiás, integratív mérőegységet, mely alkalmas *R meliloti*ban és *A. tumefaciens* fajokban a DNS-fehérje kölcsönhatások *in vivo* vizsgálatára
- 2- Alanin scanning felhasználásával meghatároztuk a *16-3 C* represszor fehérje felismerő hélixében az egyes aminosavak fontosságát az operátor kötésben.
- 3- Előállítottunk O_{R2} és O_{L2} operátor mutánsokat, és *in vivo lacZ* riportergéneken keresztüli méréssel meghatároztuk szerepüket a DNS-represszor komplexben. Célzottan a felismerő hélixben aminosavcserés represszor mutánsokat állítottunk elő, és meghatároztuk a represszió értékeket vad és mutáns operátorokkal szemben.
- 4- Izoláltunk egy megváltozott specificitású represszort, C^{Q37A} , mely a vad operátorokon gyengén, az $O_{R2}^{1-1/cg}$ mutánsan erősen represszál. Az $O_{L2}^{1-1/cg}$ paralell mutáns esetében viszont az alanin mutációt hordozó represszor alacsony értéket ad, nem képes szupresszálni.
- 5- Ez egy eltérő dokkolást lehetővé tevő oldallánc-bázis kapcsolatot azonosít. Ezzel továbbfejlesztettük az eltérő hosszúságú operátorok és a *C* represszor interakciójáról alkotott modellt.
- 6- Izoláltunk egy *pemIK* homológ addikciós modult *A. tumefaciens* C58 törzsben.
- 7- Igazoltuk az aktív transzkripciót az operonról és meghatároztuk a transzkripció startpontot.
- 8- Bizonyítottuk, hogy az operon autoregulált.
- 9- *In vitro* és *in vivo* módszerekkel meghatároztuk az operátort, bizonyítottuk a PemI és PemK fehérjék heterodimerizációját.
- 10- A PemK fehérjének a bakteriális növekedésre gyakorolt gátló hatását kimutattuk és bizonyítottuk, hogy a PemI antitoxin ezt feloldja.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. *A. tumefaciens* C58 addikciós modul

4.1.1. Transzkripció starthely meghatározása

Az általunk végzett primer extenzió eredménye szerint három lehetséges startpontról indulhat a transzkripció. Ezek a translációs starthelytől számított -18, -20 és -22 pozícióban levő nukleotidok, melyek közül a legerőteljesebb a translációs startponttól -22 nukleotidnyira található citozin. A *pemK* régióban nem találtunk belső promotert a primer extenzió alapján. Ezek alapján elmondható, hogy a két fehérje transzkripcióját a *pemI* cisztront 5' irányban megelőző promotér egység végzi. Ez az operon elrendezés a *mazEF/pemIK* család többi tagjánál is jellemző. A transzkripció során keletkező policisztronos mRNS molekulának 5' részén van az antitoxin és az ezt követő ORF-ről képződik csak a toxin fehérje a transláció során. Ez teszi lehetővé azt, hogy a toxin képződésekor már a citoplazmában levő antidotum neutralizálja fiziológiás körülmények között a toxin hatását. A két ORF az *A. tumefaciens* esetében egy nukleotidnyit átfed, ami az ORF2 (*pemK*) translációs gyakoriságát hátrányosan befolyásolhatja, translációs frame shift, ezáltal a szintetizálódó feltételezett toxin fehérjék száma alacsonyabb az antitoxinhoz képest. A translációs frame shift biztosíthatja, hogy a kromoszómális addikciós modul ne pusztítsa el a sejtet a toxin aktivációja után sem, mert a nagy moláris feleslegben keletkező antitoxin képes neutralizálni részlegesen a szabad toxin molekulákat. Az *E. coli pemIK* operonban nem található átfedés a két fehérjét kódoló cisztron között, viszont a kromoszómális homológ *chpBI* és *chpBK* ORF-ek az általunk jellemzett *A. tumefaciens pemIK* rendszerhez hasonlatosan átfednek egymással.

4.1.2. A *pemIK* operon autoregulációja

Miután megbizonyosodtunk az általunk vizsgált DNS fragmentumról induló aktív transzkripcióról, a putatív addikciós modul működőképességét vizsgáltuk. Méréseinket a genoforra épített promotér-operátor-*lacZ* fúziós riportter egységen és a TA modul különféle elemeit együtt és külön-külön induktív módon termelő plazmidokkal végeztük *E. coli*ban. Az eredmények szerint, ha csak a PemI és PemK fehérjéket termeltetjük, nem tapasztalunk promotér aktivitásbeli csökkenést. Az antitoxin önmagában *in vivo* tehát nem képes kötődni az operátor régióhoz. Ez az eredmény megfelel a más TA modulok körében tapasztaltaknak, hiszen csak a *parDE* lókuszt esetében említik, hogy a ParD antitoxin fehérje önmagában is képes regulálni az operont ugyanolyan hatékonysággal, mint a TA komplex. Ezen kívül jelzi azt is, hogy a heterológ expresszió alkalmas ebben az esetben a vizsgálatainkhoz, hiszen nem tapasztalható, hogy bármilyen *E. coli* faktor zavarná a méréseket fiziológiás körülmények között. Ha a két fehérjét koexpresszióra alkalmas felállásban vizsgáljuk, akkor viszont 48%-ra esik le a relatív promotér aktivitás. Ez azt jelenti, hogy van operátor a promotert is tartalmazó inszerten de az csak mindkét protein együttes jelenléte mellett represszálható. Ez viszont a klasszikus TA rendszerekre jellemző viselkedés.

Felmerül a kérdés, hogy mi lehet a magyarázat a viszonylag alacsony represszió értékre. Gyorsabb reagálást tesz lehetővé és valószínűleg adaptív előnyt is jelenthet a relatíve magas bazális transzkripció aktivitás fenntartása. Ez annál is inkább igaz lehet, mert ha jobban belegondolunk a translációs frame shift miatt a toxin molekulák moláris aránya nagyon alacsony lehet az antitoxinhoz képest. A rendszer túlbiztosított olyan szempontból is, hogy a proteázok által feltételezett antitoxinbontás időbeliségét is képes kompenzálni oly módon, hogy a rövid aktiváció során a sok antitoxin molekula képes pufferni, késleltetni a toxin aktivációt. Ha a stresszhatások folyamatosan, krónikusan aktiválják a proteázokat, akkor viszont az antitoxin lebomlás erőteljesebbé válik, ami a toxin aktivációhoz, antitoxin neutralizáció és autoreguláció elvesztéséhez vezet.

4.1.3. TA fehérjék komplex alkotásának vizsgálata

A denaturáló gélelektroforézis mutatja, hogy a koexpresszált TA fehérjék együtt is megjelennek a gélen, annak ellenére, hogy csak a toxin volt His-Tag jelölt. A Ni-NTA oszlopon kötődő PemK_{His}

rekombináns fehérje képes volt kötni a natív PemI antitoxint és az imidazol eluálással mindkét fehérje együtt távozott az oszlopról, ami bizonyítja a fehérje-fehérje kapcsolatok létrejöttét a feltételezett toxin és antitoxin fehérjék között. A glutáraldehid keresztkötés eredményeként a kezelés hatására csak a mindkét fehérjét tartalmazó reakcióban megjelenő 25 kDa körüli termék szerint a PemI és PemK fehérjék 1:1 arányban, heterodimerként, vannak jelen a citoplazmában jelen levő szabad komplexben. A PemI és PemK fehérjék külön nem alkotnak homodimert. Más TA rendszerek esetében jellemzően heterotetramer formában vannak jelen a TA fehérjék szabadon a sejtben, azonban az operátoron már eltérő módon alkothatnak komplexet. Az *A. tumefaciens* pemIK rendszer legközelebbi ortológjai közül csak az *E.coli* MazEF fehérjéről van pontos kristályszerkezet. Ebben a TA rendszerben például oldatban operátor nélkül 2:1 arányban heterohexamert alkotnak, a promóter-operátor egységen viszont végső soron 1:1 arányban alkotnak komplexet a toxin és antitoxin fehérjék, ráadásul a komponensek itt külön is képesek homodimereket alkotni. Annak eldöntésére, hogy melyik régió felelős az antitoxin DNS kötésért és a fehérje-fehérje interakcióért a toxin fehérjével, érdemes lenne olyan mutációkat generálni a feltételezett protein régión, melyek funkcióvesztést okoznak, ezáltal meghatározhatóak lennének a kötésben fontos aminosav oldalláncok.

4.1.4. A pemIK operátor azonosítása *in vivo* és *in vitro* módszerekkel

A footprint kísérletek kijelölnék egy 20 bp hosszú fordítottan ismétlődő részleges palindrom régiót, melynek pont a közepén van a szimmetriatengelye és így 10-10 bp hosszú két félkötőhelyet tartalmazó elrendezést feltételezhetünk az operátor szerkezetét illetően. A két kötőhely meglete egyezik az irodalomban nagyon sok más TA modul szabályozó régiójának felépítésével. Az *E. coli* pemIK modul esetében 18 bp hosszú az operátor és két teljesen szimmetrikus, fordítottan ismétlődő részből áll, részlegesen átfedve a promóter -10-es régiójával. A kötőhelyek az általunk vizsgált esetben is átfednek a transzkripció starthelyével és a feltételezett -10-es promóter box résszel. Ez a represszió mechanizmusát is magyarázza, hiszen ily módon direkt gátolja a PemIK komplex az RNS polimerázt, ezáltal csökkenti a transzkriptumok, saját fehérjéit kódoló mRNS, képződésének valószínűségét.

Az *in vitro* kísérletek által kijelölt operátort 5' irányban határoló adenin szerepe is kérdéses a szabályozási funkció szempontjából, jöllehet ez felborítaná a szabályozó egység szimmetriáját. Annak eldöntésére, hogy ténylegesen hol is van az operátor határa olyan mutánsokat terveztünk, mely *in vivo lacZ* riportergéne keresztül alkalmasak a kérdés tisztázására.

Az M1 mutáció (A→C) asszimmetrikus az operátor pozíciót tekintve, a szabályozó elem footprintek által kijelölt 5' határát hivatott eldönteni. Az M2 mutáció szimmetrikus az operátor pozícióra nézve (T→A és A→C) a diád szimmetriát mutató részleges palindrom határait jelöli ki, míg a szintén szimmetrikus M3 mutáns operátor (G→T és C→G) belső bázisokat és a transzkripció startpont részét érinti.

A vad operátorhoz képest az M1 mutáció bevezetése nem csökkentette a szabályozó egység működésének hatékonyságát, tehát nem része a szabályozó egységnek. Az M2 mutáció okozta drámai repressziócsökkenés kijelöli az operátor szélső határait. A mért eredmények világosan jelölik az operátor pontos méretét és nukleotidsorrendjét, TGTGCTACAT-ATGTTGCACA. Az M3 mutáció pedig jelzi, hogy a TA komplex legfőbb autoregulációs feladata a saját operon transzkripciójának gátlása, szabályozása, hiszen a promóter részt érintő sérülés az autoreguláció teljes megszűntét eredményezte. A hidroxil-gyök interferencia footprint jelzi, hogy a két félkötőhely nem egyenértékűen módosul a kémiai kezelés hatására, hiszen némileg asszimmetrikus protekció figyelhető meg a gélen az eltérő operátor részek iránt a represszor részéről. Érdemes lenne olyan mesterséges, szimmetrikus félkötőhelyeket és csak egy félkötőhelyet tartalmazó konstrukció létrehozása, amely tisztázná a félkötőhelyek pontos szerepét és hierarchiáját.

4.1.5. A PemIK rendszer fiziológiás szerepe

A TA modulok számos fiziológiás szerepet tölthetnek be az élő sejtekben. Az *A. tumefaciens* pemIK addikciós modulja legközelebbi rokonságot az *E.coli mazEF/pemIK* csoportjához mutatja. Ezen

fehérjékre jellemző, hogy a transzkripció gátlásán keresztül elpusztítják a sejteket vagy legalábbis jelentősen csökkentik a növekedésüket. A kromoszómán található TA modulokra, mint a *mazEF* és *chpBIK*, az utóbbi jellemző. Az általunk vizsgált addikciós rendszer szabályozó része viszont szerkezetileg inkább hasonlít a plazmid stabilitási faktorként ismert *E. coli pemIK* génekhez. Ennek tanulmányozására a natív toxin, antitoxin és a két fehérje együttes expressziójára alkalmas kísérleti rendszert dolgoztunk ki. Ez egy klasszikus kísérlet a TA modulok jellemzése során és a kapott eredmények teljesen beleillenek a család más tagjainál tapasztaltakba. Amikor a kísérlet során a kontroll csoport elérte az exponenciális fázist, az indukciót követő 150 perc után, még nem volt látványos eltérés a növekedési görbék tekintetében, viszont a stacioner fázis elérésekor, $OD_{600} \approx 2$, a csak toxint termelő baktériumok csupán $OD_{600} \approx 0,4-0,5$ értéket mutattak és nem emelkedett a mért adat a későbbiekben sem jelentősen. A 390. percben a kontroll és az antitoxint (PemI), illetve a TA fehérjét együtt termelő sejtek közel hatszor magasabb optikai denzitást mutattak a csak toxint termelőkkel összevetve. A natív PemK toxin erőteljes expressziója tehát jelentősen csökkentette a sejtek növekedését. A gátlás pontos mechanizmusa még tisztázandó, aminek érdekében érdemes lenne az mRNS bontó aktivitást kimutatni. Erre nagyon hatékony lenne egy qPCR alapú vizsgálat és primer extenziós elemzés a kandidáns gének között.

4.2. 16-3 fág C represszor

4.2.1. 16-3 bakteriofág egy kópiás mérőegységének előállítása

A 16-3 fág integrációs rendszerét felhasználva előállítottunk egy olyan mérőegységet, mely alkalmas lehet *R. meliloti*-ban a pontmutációk, aminosavcserék hatásainak nagyon precíz vizsgálatára a 16-3 fág C represszor és operátorainak kölcsönhatása során. Az eredmények megerősítik a korábban *E. coli*-ban λ RS45fág felhasználásával előállított egy kópiás rendszeren kapott eredményeket, melyek gyakorlatilag ugyanilyen repressziót mutattak a két vad operátoron. Az is megfigyelhető, hogy a hosszabb operátor (O_{R2}) mindkét fájnál kis mértékben magasabb repressziót adott, továbbá a rövidebb operátort tartalmazó promóterhez képest magasabb alapaktivitást mutatott (14 MU a *R. meliloti* és 21 MU az *A. tumefaciens* esetében). Az O_{R2} operátort tartalmazó promóter-operátor egység által produkált magasabb alapaktivitás a két promóter szerkezetében levő minimális eltéréssel magyarázható, ami nem befolyásolta a mért represszió értékeket.

4.2.2. Alanin scanning

Az alanin mutáció bevezetése a felismerő hélixbe minden pozícióban és mindkét operátoron jelentősen csökkentette a mért repressziót, ami azt jelenti, hogy minden pozíció fontos a felismerő hélixben a DNS-fehérje komplex hatékony és specifikus kialakításához. Legerősebb funkcióvesztés a Q37 pozícióban figyelhető meg, míg a legkisebb jelentőségű a kötés szempontjából az N42 és N43 aminosavak oldalláncainak eliminálása a DNS-fehérje komplexből. A Q37, Q38, I40, N41 N42 aminosavak oldalláncai kapcsolódnak az operátor megfelelő nukleotidjaival, míg az N43 oldallánc a komplex egészének térszerkezeti stabilitásában vehet részt. A két vad operátort összehasonlítva az egyes mutáns represszorokkal minden aminosav alanin cseréje hasonlóan rontotta el a repressziót.

4.2.3. Operátor mutánsok vizsgálata

Az előállított komplett operátor mutáns sorozat tesztelése a vad represszorral figyelemre méltó eredményeket adott.

A mutáns operátorokon vad represszorral kapott mérési eredményekből láthatjuk, hogy a leginkább lecsökkent R értékeket, legnagyobb hatású mutációk, a 2-2 mutáns operátorok csoportja és az 1-1 pozíciók $O_{R2}^{1-1/gc}$ mutációi mutatják. A legmagasabb R értékeket, legkisebb hatású mutációk, a $O_{R2}^{1-1/ta}$, $O_{R2}^{3-3/gc}$, $O_{R2}^{3-3/ta}$ és $O_{R2}^{4-4/cg}$, $O_{R2}^{4-4/ta}$ csoportok adták. Ezek közül csak a $O_{R2}^{3-3/gc}$ és $O_{R2}^{4-4/cg}$ közelítik meg a fenotipikusan lizogéniát adó fájnál mért R értékeket, a többi esetben viszont valószínűleg nem beszélhetünk lizogéniát adó fenotípusról 'in phage' szituáció esetében akkor, ha a O_r^c-1 operátor mutánsát vesszük alapul ($R=0,54$). A báziscseréket figyelembe véve elmondható,

hogy a legkisebb hatású mutációk minden esetben azok voltak, melyek során az eredeti nukleotidokat szimmetrikusan megfordítottuk. Ilyenek az 1-1 esetben az $OR_2^{1-1/ta}$ ($R=0,6$), a 3-3 mutációk közül a $OR_2^{3-3/ta}$ ($R=0,58$), a 4-4 csoportban a $OR_2^{4-4/ta}$ ($R=0,53$), melyek mindegyikében az eredeti A-T pozíciókban T-A cserét generáltunk, illetve a 2-2 csoport mutációi közül a $OR_2^{2-2/gc}$, melynél a C-G bázisokat cseréltük le G-C nukleotidokra. Mindegyik mutáció az adott csoport legmagasabb R értéket mutató tagjai közé sorolható. Érdekes, hogy a legkisebb hatású változások a mért repressziókban ennek ellenére az $OR_2^{3-3/gc}$ operátornál ($R=0,73$), A-T \rightarrow G-C cserében, és az $OR_2^{4-4/gc}$ mutáció bevezetésénél mérhető (A-T \rightarrow C-G csere, $R=0,66$). Megfigyelhető általában, hogy a 2-2 és 1-1 pozíció $OR_2^{1-1/gc}$ mutációi adták a legnagyobb represszió csökkenést, így ezek szolgálhatnak alapul a megváltozott specificitású represszor izolálása során az operátor oldalról. Ezekkel a nukleotidokkal a felismerő hélix 1. és 2. aminosavainak oldalláncai tarthatnak kapcsolatot, ezért a későbbiekben ebben a régióban végeztünk mutagenézist.

4.2.4. Megváltozott specificitású represszor vizsgálata vad és mutáns OR_2 operátorokon

A represszor mutánsok nem terjedtek ki minden aminosavcsere előállítására a HTH régió felismerő hélix 1. és 2. pozíciójában de ez nem is volt feladatunk, hiszen egy olyan mutáns represszor izolálása volt a célkitűzés mely szupresszálni tudta valamely operátor mutációját.

A mutáns OR_2 típusú operátorokon és a számos aminosavcsérés represszorral kapott mérési eredményekből megállapíthatjuk, hogy a represszorban végzett aminosavcserek minden esetben drámaian csökkentették a fehérje funkcióját minden operátoron vizsgálva. Ez alól kivétel az $OR_2^{1-1/cg}$ operátor viselkedése a C^{Q37Ala} represszor mutánssal mérve. Ebben az esetben a vad OR_2 operátoron nagyon alacsony represszió értéket mértünk az alanin cserét hordozó represszorral ($R=0,11$), ellenben a C-G mutációt hordozó operátoron a vad represszor vad operátoron mért értékét is meghaladó nagyon magas repressziót kaptunk ($R=0,90$). A vad represszor a mutáns $OR_2^{1-1/cg}$ operátoron csak közepes R értéket mutatott ($R=0,52$), így a mutáns alanin csérés represszorunkról elmondhatjuk, hogy szupresszálni képes az operátor mutációt, ami annyit jelent, hogy sikerrel izoláltunk egy megváltozott specificitású szabályozó fehérjét egy OR_2 típusú operátoron.

Már előzőekben ismert, hogy 16-3 C represszor hatékony repressziót ad a 434 fág operátorán, ahogyan a 434 fág represszora hatékonyan működik a 16-3 OR_2 operátoron. A megváltozott specificitású szabályozó fehérje izolálása megerősíti azt a korábbi feltételezést, mely szerint a Gln37 oldallánca, a felismerő hélix első aminosavja kapcsolódik az operátor első A bázisához a DNS-fehérje komplexben. Ennek alapja az a megfigyelés, hogy a 434 represszornál a Gln28 pozíció a felismerő hélix első aminosavja ebben a rendszerben, alanin cséréje szintén szupressziót ad abban az esetben, ha az operátor A-T \rightarrow T-A szimmetrikus báziscsérés mutációt hordoz. A 16-3 esetben az A-T \rightarrow C-G szimmetrikus báziscsere által mutatott megváltozott specificitás bázis specifikus, mert a másik két nukleotiddal nem mutat hatékony repressziót. Mindez azt feltételezi, hogy a rövid alanin oldallánc új és specifikus kapcsolatot képes kialakítani a C-G bázisokkal, mely nem funkcióképes a vad glutamin oldallánccal.

4.2.5. Megváltozott specificitású mutáns represszor viselkedése OL_2 típusú operátoron

Az igazán érdekes része csak most érkezett el munkánknak, hiszen az $OR_2^{1-1/cg}$ mutációt a hosszabb operátoron képesek voltunk szupresszálni egy C^{Q37Ala} mutáns represszorral de vajon hogy viselkedik ez a felállítás a rövidebb operátor esetében? A rövidebb mutáns operátoron, $OL_2^{1-1/cg}$, az alanin szubsztitúciós, C^{Q37Ala} , és a vad represszor egyaránt alacsony R értéket adott ($R=0,29$ illetve $0,24$).

A kapott eredmények azt tükrözik, hogy az alanin mutáns represszor nem képes szupresszálni az 1-1 pozícióban C-G mutációt hordozó rövidebb operátort. A rövid, hidrofíln alanin oldallánc csak az $OR_2^{1-1/cg}$ típusú operátor mutánssal alakít ki nagyon erős, új kontaktust. A pontos molekuláris mechanizmust csak egy kristályszerkezet tudná megoldani.

Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az OL_2 típusú szabályozó elem más módon alakít ki specifikus kapcsolatot a fehérjével a komplex képzés során.

Összességében a két eltérő operátoron végzett elemzések azt mutatják, hogy bár hasonlóan hatékonyak funkcionálisan, mégis más felismerési elrendeződést mutatnak a represszor fehérje homodimerek az eltérő operátorokon. A represszor ilyen nagy mértékű flexibilitása megerősíti a rotációsan flexibilis protein homodimer modell létjogosultságát.

A megváltozott specificitású represszor izolálásával, tulajdonképpen egy olyan eszközt hoztunk létre, mely alkalmas DNS-fehérje kapcsolatok esetében nagyon finom részletek modellezésére, leírására kristályszerkezet létrehozása nélkül.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat témakörében megjelent publikációk

IF, SCI folyóiratbeli cikkek

Ferenczi S, Orosz L, Papp PP. (2006): Repressor of phage *16-3* with altered binding specificity indicates spatial differences in repressor-operator complexes. *J Bacteriol*, **188** (4), 1663-6

IF: 4,146

Bodogai M, **Ferenczi S**, Bashtovyy D, Miclea P, Papp P, Dusha I. (2006): The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. *MPMI*, **19**, (7) 811-822

IF: 4,054

Blaha B, Semsey S, **Ferenczi S**, Csiszovszki Z, Papp PP, Orosz L. (2004): A proline tRNA(CGG) gene encompassing the attachment site of temperate phage *16-3* is functional and convertible to suppressor tRNA. *Mol Microbiol*, **54** (3), 742-54.

IF: 5,959

Ferenczi S, Ganyu A, Blaha B, Semsey S, Nagy T, Csiszovszki Z, Orosz L, Papp PP. (2004): Integrative plasmid vector for constructing single-copy reporter systems to study gene regulation in *Rhizobium meliloti* and related species. *Plasmid*, **52** (1), 57-62.

IF: 1,542

Papp PP, Nagy T, Ferenczi S, Elo P, Csiszovszki Z, Buzas Z, Patthy A, Orosz L. (2002): Binding sites of different geometries for the *16-3* phage repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, (13), 8790-5.

IF: 10,452

Konferencia kiadvány (proceeding):

Nemzetközi

Monica Bodogai, **Szilamér Ferenczi**, Paul Miclea, Péter Papp and Ilona Dusha (2005): The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. Szeged, 2005. november 16-18.

Előadás, poszter bemutatás

Nemzetközi

Monica Bodogai, **Szilamér Ferenczi**, Paul Miclea, Péter Papp and Ilona Dusha (2005): The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. Szeged, 2005. november 16-18.

Magyar

Ferenczi, Sz., Papp, P. P. (2006): Az *Agrobacterium tumefaciens* PemIK toxin-antitoxin rendszerének jellemzése, Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztályának Munkaértekezlete, Pécs, Poszter