

**Egy pleiotróp hatású autoregulátor génjének molekuláris
genetikai analízise *Streptomyces griseus*ban**

Készítette: Birkó Zsuzsanna

Készült: DEOEC, Humángenetikai Intézet

2002

TARTALOM

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Streptomycesek életciklusa	7
2.1.1. <i>Streptomycesek</i> életciklusa szilárd táptalajon	7
2.1.2. <i>Streptomycesek</i> életciklusa folyékony táptalajon	9
2.2. A morfológiai differenciálódás génszintű szabályozása	11
2.2.1. SapB fehérje szerepe a légmicélium képzésben	11
2.2.2. Az A faktor által szabályozott regulációs kaszkád modellje	12
2.2.3. A C faktor kutatás előzményei	15
2.2.4. Az AmfC illetve az Orf1590 fehérje, mint az A faktor mutáció szupresszora	16
2.2.5. Spóráképzésben résztvevő <i>whi</i> gének <i>S. coelicolor</i> ban	17
2.3. Streptomycin termelés szabályozása <i>S. griseus</i>ban	20
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
3.1. A kísérletek során felhasznált törzsek	23
3.1.1. <i>Streptomyces</i> törzsek	23
3.1.2. <i>E. coli</i> törzsek	24
3.2. Táptalajok	25
3.2.1. <i>Streptomyces</i> törzsek tenyésztésére használt folyékony táptalajok	25
3.2.2. <i>Streptomyces</i> törzsek tenyésztésére használt szilárd táptalajok	27
3.2.3. <i>Streptomycesek</i> protoplasztálásához használt táptalaj	28
3.2.4. <i>E. coli</i> törzsek tenyésztésére használt táptalaj	29
3.2.5. Titráló táptalaj antibiotikum koncentráció meghatározásához	29
3.2.6. <i>Streptomycesek</i> tenyésztési körülményei	29
3.3. Molekuláris biológiai módszerek	30
3.3.1. A kísérletek során használt vektorok	30
3.3.2. <i>Streptomyces</i> kromozómális DNS izolálás	31
3.3.3. Plazmid izolálás <i>Streptomycesek</i> ből alkalikus lízissel	32
3.3.4. <i>Streptomyces</i> törzsek transzformációja	33
3.3.5. RNS izolálás <i>Streptomycesek</i> ből	34
3.3.6. S ₁ nukleáz térképezés	35
3.3.7. Minigénbank készítése	35
3.3.8. Telehibridizáció	36
3.3.9. His-tag jelölt C faktor fehérje termeltetése <i>Streptomyces</i> ben és a fehérje minták előkészítése SDS-PAGE gélen való futtatáshoz	37
3.3.10. His-tag jelölt C faktor fehérje termeltetése <i>E. coli</i> ban és tisztítása	

	3
Ni-NTA oszlopon natív körülmények között.	38
3.3.11. C faktorra kölcsönható fehérje keresése	39
3.3.12. Antibiotikum koncentráció mérése agar diffúziós módszerrel	40
3.3.13. Alapvető molekuláris biológiai módszerek	41
4. EREDMÉNYEK	42
4.1. A C faktor gén 5'-végének amplifikálása PCR reakcióban	42
4.2. A C faktor gén kónozása, azonosítása	43
4.3. A pBZ3 klón szekvencia analízise	44
4.4. A C faktor fehérje molekulatömegének és aminosav sorrendjének meghatározása HPLC/ESI-MS/MS módszerrel	50
4.5. A C faktorra homológ fehérje keresése	51
4.6. A C faktor gén azonosítása különböző <i>Streptomyces</i> törzsekben	51
4.7. Transzkripció start pont azonosítása S1 nukleáz térképezéssel	53
4.8. A C faktor promóterének in vivo promóter próba analízise <i>S. coelicolor</i> ban	57
4.9. A C faktor expressziójának hatása a <i>S. griseus</i> 52-1 törzsre	58
4.10. A C faktor expressziójának hatása <i>S. griseus</i> NRRL B-2682 törzs <i>bald</i> mutánsaira	62
4.11. Antibiotikum termelés változása alacsony és magas kópiaszámú C faktor gén hatására <i>S. griseus</i> törzsekben	67
4.12. C-terminálisan His-tag jelölt C faktor konstrukciója és expressziója <i>Streptomyces</i> törzsekben	70
4.13. C-terminálisan His-tag jelölt C faktor konstrukciója és expressziója <i>E. coliban</i>	73
4.14. His-tag jelölt C faktor fehérje biológiai aktivitásának mérése	76
4.15. A C faktorra kölcsönható fehérje ill. fehérjék keresése	78
5. MEGBESZÉLÉS	80
6. ÖSSZEFOGLALÁS	90
7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	92
8. IRODALOMJEGYZÉK	93
8.1. Hivatkozások	93
8.2. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények	102

1. BEVEZETÉS

A *Streptomyces*ek Gram pozitív, micéliális növekedésű baktériumok, melyek az Irodalmi áttekintés című fejezetben ismertetett komplexitású életciklussal rendelkeznek és ezzel összefüggésben értékes szekunder metabolitokat, így például a gyógyításban is használt antibiotikumokat termelnek. Morfológiai differenciálódásuk szilárd táptalajon spóra képzéssel végződik, míg folyékony tápközegben csak néhány törzs, például az általunk vizsgált *Streptomyces griseus* megy át spóráképzéssel járó teljes differenciálódáson. Az életciklus génszintű szabályozásában, a légmicélium, illetve a spóráképzésben különböző regulációs kaszkádok működnek közre. A többféle szabályozó rendszer párhuzamos jelenléte egyfajta túlbiztosítást jelent a *Streptomyces*ek számára, hisz a légmicélium illetve a spóráképzés túlélésükhöz elengedhetetlen.

A *S. griseus* 45H törzsből az intézetünkben tisztított C faktor szintén szerepet játszik a differenciálódás szabályozásában. Munkám során a célkitűzések között első helyen szerepelt a C faktor fehérjét kódoló gén klónozása, szekvenciájának és a szekvencia alapján a szabályozó régiók meghatározása. A bázissorend ismeretében mód van annak a kérdésnek a megválaszolására is, hogy a C faktor valóban cink-ujj típusú DNS-kötő fehérje-e. Továbbá fontos feladatunknak tekintettük, hogy komputeres szekvencia analízáló programok felhasználásával a C faktorra homológ gént illetve fehérjét keressünk. A fehérje termék pontos funkciójának megállapításához közelebb vivő következő fontos lépésként a gén expresszió idejének vizsgálatát irányoztuk elő. A korábbi eredmények szerint a C faktor minden *Streptomyces*ben, sőt más baktériumokban is megtalálható. Ezek az adatok a C faktor ellen termeltetett mono- illetve poliklonális antitesttel végzett kísérletekből származnak, most azonban a klónozott gén birtokában lehetőség nyílt arra, hogy részben Southern hibridizáció alkalmazásával, részben pedig adatbázisok felhasználásával ezeket az eredményeket teszteljük.

In vivo kísérletsorozat keretében terveztük a C faktor gént alacsony, illetve magas kópiaszámú plazmidról különböző spórázó és differenciálódásban blokkolt *S. griseus* törzsből kifejeztetni folyékony és szilárd táptalajon egyaránt. Ezekből a kísérletekből a C faktor hatásmódjára kívántunk adatokat szerezni. A C faktor esetén nem ismert, hogy mely regulációs kaszkád tagja, ezért további célul tűztük ki a C faktorra kölcsönható fehérje,

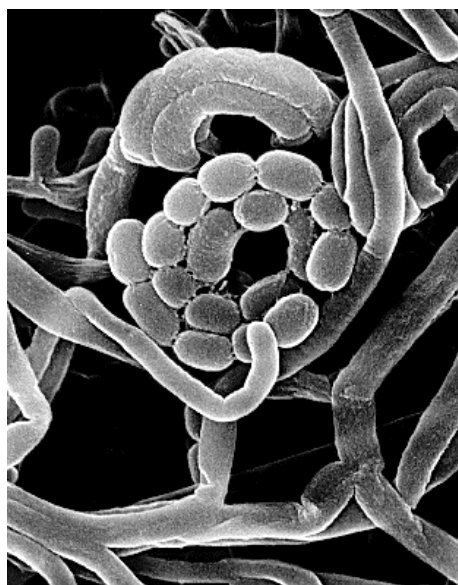
illetve fehérjék azonosítását, amihez először meg kellett oldani a C faktor fehérje nagy koncentrációban történő hatékony előállítását.

Amint már említettem, a differenciálódás folyamata összefügg a szekunder metabolitok közé tartozó antibiotikumok termelésével. Vizsgálati objektumunk, a *S. griseus* a gyógyszer alapanyagként is használt streptomycin nevű antibiotikumot termeli. Végezetül döntő fontosságú volt annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a C faktor alacsony illetve magas kópiaszámban hatással van e a törzs streptomycin termelésére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Streptomyces*ek az Actinomycetes osztály Actinomycetales rendjének egyik legjelentősebb, legtöbbet tanulmányozott genusát alkotják, mely genus több mint 700 millió éven keresztül függetlenül fejlődött az ugyancsak Gram pozitív *Bacillus subtilis*től (Horinouchi, 1999) és lépett a baktériumok között nem megszokott komplexitású evolúciós útra. A *Streptomyces*ek szaprofita talajbaktériumok, a talajok természetes populációjának 1-20 %-át alkotják. Néhány kivételes esettől eltekintve nem termelnek növényekre, állatokra vagy emberre nézve toxikus anyagokat. Az Actinomycetesek jellegzetes ismertetőjegye más Gram pozitív baktériumokkal szemben, DNS-ük 55 %-nál magasabb G+C tartalma (Champness, 2000).

A *Streptomyces*ek a kutatók érdeklődését egyrészt fonalas növekedésükkel vívták ki, mely fonalak spóráképzéssel végződő sajátos differenciálódáson mennek keresztül az élelciklus során (1. ábra), másrészt pedig azzal, hogy ez a komplex morfológiai differenciálódás változatos és nagyszámú szekunder metabolit termelésével jár együtt. A szekunder metabolitok között található a több mint 12000 ismert antibiotikum közel 70%-a. A gyógyászatban használt bioaktív anyagok kb. 55 %-át a *Streptomyces*ek termelik. (Champness, 2000)



1. ábra *Streptomyces coelicolor* spóralánca (scanning elektromikroszkópos felvétel) (Chater, 1989).

A *Streptomyces* kromoszóma 8×10^6 (8 Mb) bázispárból áll, mely a többi baktériuméhoz képest szokatlanul nagy, kétszer akkora például, mint a jól ismert *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* genom mérete. További különbség a tipikus gyűrűvé záródott bakteriális kromoszómától eltérő lineáris struktúra. A szokatlanul nagy genom méret magyarázatát a 2001-ben befejeződött *Streptomyces coelicolor* genom project szekvenálási eredményeinek kiértékelésétől várhatjuk. Az természetesen már most is nyilvánvaló, hogy az antibiotikum termelésben, a morfológiai differenciálódásban és ezen folyamatok szabályozásában közvetlenül csupán néhány száz gén vesz részt (Redenbach és mtsai., 1996), ami nem ad magyarázatot a nagy méretbeli különbségre.

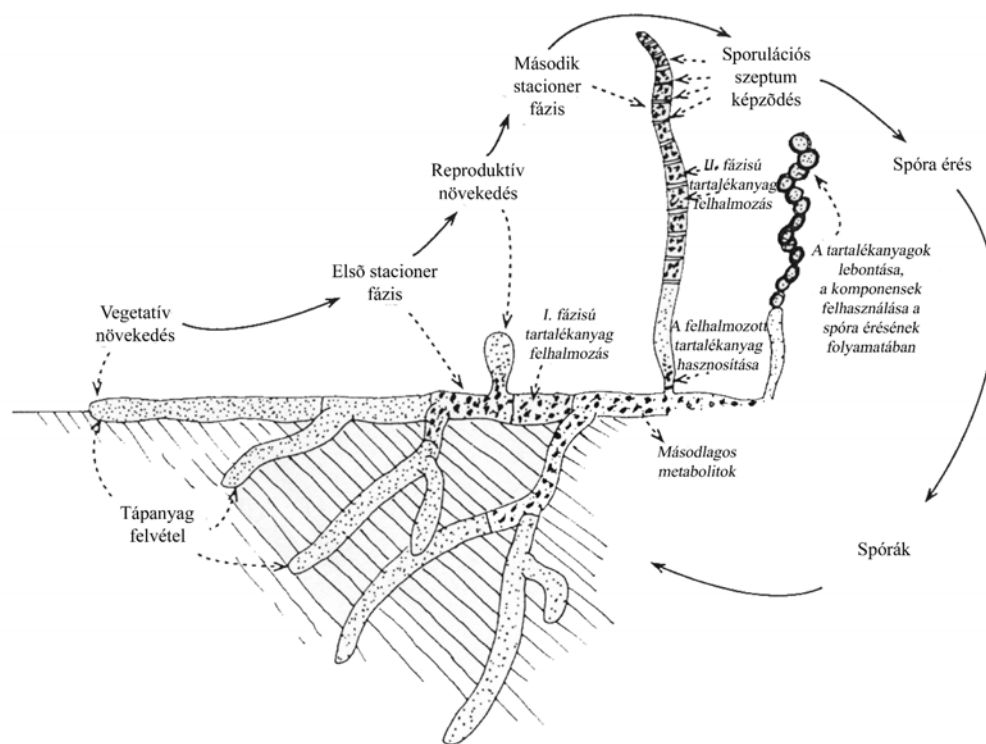
2.1. Streptomycesek életciklusa

2.1.1. Streptomycesek életciklusa szilárd táptalajon

Az életciklus szilárd táptalajon a spóra csírázásával veszi kezdetét, a képződő csíracső sejtfalának csúcsi része intenzív növekedésnek indul. A növekedéssel párhuzamosan a kromoszóma sorozatos osztódásokon megy keresztül, a megsokszorozódott genetikai állományt elválasztó harántfalak azonban csak igen ritkán képződnek. A kisszámú harántfal nem teszi lehetővé a micélium 1 genomot tartalmazó sejtekre való tagolódását (Chater, 1984). A DNS néhány replikációs ciklusa után a vegetatív hifa oldal irányban több helyen elágazik. A legtöbb elágazás szeptumhoz közeli helyen történik. A hifa csúcsa mögötti részén képződő első szeptum a hifát apikális és szubapikális részre tagolja. A szubapikális területen sejtfal szintézis nem folyik, de DNS szintetizálódik, míg az apikális területre mindkét folyamat jellemző. A lineárisan növekvő vegetatív micélium elágazásai révén a micélium össz-tömegének kvázi-exponenciális növekedését eredményezi (Chater és Losick, 1997). A vegetatív micélium a táptalajban nő, sűrűn behálózva azt, ezért szubsztrát micéliumnak nevezzük (Prosser és mtsai., 1988; Chater, 1993).

Idővel a tápanyag csökkenésének vagy más fiziológiai stressznek, illetve a sejtsűrűség emelkedésének hatására a szubsztrát micélium idősebb részei lizálnak. A kannibalizmus jelenségéhez hasonlóan pedig, a felszabaduló szerves anyagokat hasznosítva, a szubsztrát micéliumra merőlegesen ún. légmicélium képződik. A vizes közegből kiemelkedő légmicélium csúcsi részén intenzív sejtfal szintézis folyik, melyhez

szükséges tápanyagok a légmicélium alapi részéről a csúcsi rész felé diffúzióval szállítódnak. Számos *Streptomyces*-ben, így például a modellnek számító *Streptomyces coelicolor*-ban is, a légmicélium két részre tagolható: egy viszonylag egyenes lefutású alapi és egy hosszú, spirálisan csavarodott csúcsi részre. Ez a spirális struktúra ebben a régióban valószínűleg a peptidoglikán keresztkötések számának csökkenése révén jön létre, ami egyben a sejtfal gyorsabb növekedését teszi lehetővé. A légmicélium növekedésével párhuzamosan - mely teljes hosszát a szubsztrát micélium 90-120 órás növekedését követően, kb. 9-14 óra alatt éri el - a kromoszóma folyamatos osztódásokon megy keresztül (Chater, 2000). A hossznövekedés befejeződésével a légmicéliumban szinkron módon harántfalak képződnek, melyek egy genomot tartalmazó sejtekre tagolják a hifát. Ez a prespóra állapotnak felel meg. A sporulációs harántfalak különböznek a vegetatív válaszfalaktól abban a tekintetben, hogy a sporulációs harántfalak esetében a két membrán réteget egy dupla rétegű sejtfal választja el, mely az érett spórák leválását teszi lehetővé (Kwak és Kendrick, 1996). A spórák érése során sejtfaluk megvastagszik és pigmentálódik, alakjuk kerekesebb lesz. Érett spórákat kb. 6-7 napos telepek képeznek (2. ábra).



2. ábra A morfológiai differenciálódás különböző stádiumait együttesen bemutató *Streptomyces* telep sematikus metszete szilárd táptalajon (Chater, 1998).

2.1.2. *Streptomycesek* életciklusa folyékony táptalajon

Bizonyos *Streptomycesek*nek, így például az általunk tanulmányozott *Streptomyces griseus*nak folyékony táptalajon is spóra képzéssel végződő teljes életciklusa van (Kendrick és Ensign, 1983). Mélyfermentációban az életciklus a vegetatív fázis első szakaszát képző csírázással veszi kezdetét. A vastag falú, kissé hidrofób felszínű spórák nedvesedés után, kielégítő tápanyag és oxigén ellátás mellett csírázni kezdenek. A spórák felszínén képződő kis kidudorodások egyre hosszabb csírává növekednek, melyek a fonalkezdeményeknek felelnek meg. A csírázást követően 7 és 16 óras kor között a vegetatív ciklust az intenzív, kvázi-exponenciális növekedés jellemzi. A micélium egészének növekedése az elágazások révén válik közel exponenciálissá. Ebben a szakaszban a DNS mennyisége átlagosan kb. ötször duplázódik meg. A csúcsi régióban lévő kromoszómák ennél lényegesen többször, míg a máshol előfordulók kevesebbszer osztódnak. A vegetatív fázis harmadik szakasza az átmeneti stádium. Átmenetet képez a vegetatív és a reprodukív szakasz között. A DNS replikációja leáll, gyakran a meglévő DNS mennyisége néhány százalékkal csökken is. A fonalak lizálására utaló jel nem nagyon látható. Ezzel a szakasszal lezárul az életciklus vegetatív fázisa.

A reprodukív növekedési szakaszban, 30-36 óras kor körül a fonalak két irányban differenciálódnak tovább, aminek eredményeként öregedő vegetatív fonalak és reprodukív ágak különböztethetőek meg. A DNS a reprodukív ágakban osztódásnak indul, emellett az idős vegetatív fonalak maganyagai is duplázódnak egyszer. Mind a citológiai, mind a kémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a reprodukív hifák, melyek 36 és 72 óras kor között növekednek, nem az öreg vegetatív fonalak átalakulásával jönnek létre. A reprodukív vagy sporogén hifának folyékony táptalajon két típusa különböztethető meg: a disztális sporogén hifa a vegetatív fonalak csúcsi részén képződik, míg a proximális sporogén hifa a vegetatív fonalak oldal irányú elágazásaként jön létre (Kwak és mtsai., 2001). Az antibiotikum termelés és más szekunder metabolitok termelése erre az életszakaszra esik.

A spóráképzés és autolízis szakaszában, melyben már nincs DNS és fehérje szintézis, a légmicéliumra jellemző sporulációs harántfalak képződésével a sporogén hifa egy genomot tartalmazó sejtekre tagolódik, ezt a spórafal kiépülése és a spórák lekerekedése követi. Az érett spórák egyesével vagy spóraláncokat képezve lefűződnek. Az előregedett vegetatív hifa autolizál a szakasz végén.

A szilárd illetve folyékony táptalajon végbemenő élekciklust összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy folyékony tápközegben a morfológiai differenciálódás 3-4 nap alatt és viszonylag szinkronizáltan játszódik le. Szilárd táptalajon ez a folyamat 6-7 napot vesz igénybe és aszinkronizált, minek értelmében ugyanazon tenyészetben különböző differenciáltsági stádiumban lévő hifák egyszerre vannak jelen, ami megnehezíti a differenciálódás szabályozásában szerepet játszó gének élekciklushoz kötött expresszió változásainak és betöltött funkcióiknak megállapítását. Ennek a jelenségnek a hátterében valószínűleg az áll, hogy a vizes közegből kiemelkedő légmicéliumok közötti kommunikációs lehetőség beszűkül, a légnemű közeg erősen korlátozza a szinkronizációt biztosító autoregulátorok hifák közötti kapcsolatteremtését.

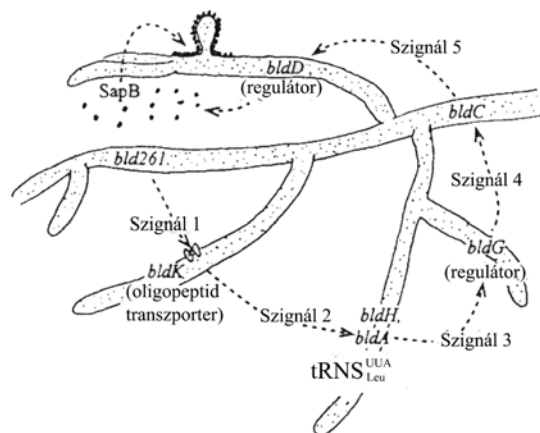
2.2. A morfológiai differenciálódás génszintű szabályozása

A morfológiai differenciálódás bekapcsolásában és a differenciálódással összefüggő változások szabályozásában mind szilárd, mind folyékony táptalajon valószínűleg több, egymással kapcsolódó és egymásra ható regulációs rendszer működik közre. Ezen folyamatokban szerepet játszó gének azonosításában, az élekciklus eltérő stádiumaiban való expressziójuk analizálásában kiindulási pontként a különböző differenciálódási rendelleneségeket mutató mutánsok szolgálnak. Azon *Streptomyces* mutánsokat, melyek szilárd táptalajon nem képeznek légmicéliumot és a telepek felszíne ennek következtében borszerű, *bald* (kopasz) mutánsoknak nevezzük. A másik nagy csoportot a *white* mutánsok alkotják, melyeknél légmicélium megfigyelhető, de a pigment termeléssel is járó spórák képzése, érése zavart szenved ezért a telepek felszíne fehér.

2.2.1. SapB fehérje szerepe a légmicéliumképzésben

A mutánsok analízise alapján levezethető regulációs kaszkádok a modellnek számító *Streptomyces coelicolor*ban ismertek a legjobban. E törzsben a légmicélium képzésben kulcsszerepet tölt be a SapB peptid (Willey és mtsai., 1991; Nodwell és mtsai., 1996), mely feltehetőleg a telep felszínén növe vegetatív micéliumból elágazó légmicélium kezdeményekhez kapcsolódik. Az így módon beburkolt légmicélium a felületi feszültséget legyőzve a vizes fázisból kiemelkedik. A SapB valószínűleg nem csak a légmicélium felszíni komponense, hanem a légmicélium képzés indukálásában, mint diffúzibilis

extracelluláris szignál molekula is szerepet játszik (Willey és mtsai., 1993). A SapB peptid termelésében és ezzel összefüggésben a légmicélium képzésben számos *bald* gén vesz részt. Egyes *bald* gének termékei a hifák között diffúzióval terjedő extracelluláris szignál molekulaként funkcionálnak, míg más gének ezen szignálok kontrollja alatt expresszálódnak. Bizonyos *bald* mutánsok szilárd táptalajon más *bald* mutánsok mellett tenyésztve légmicélium képzést indukálnak. A komplementációs csoportok száma alapján legalább öt extracelluláris szignál feltételezhető (Chater, 1993). A vegetatív micéliumból szekrécióra kerülő 1. szignált, mely egy oligopeptid és a *bld261* gén terméke (Nodwell és mtsai., 1996), a *bldK* gén által kódolt, öt alegységből álló ATP-dependens oligopeptid permeáz veszi fel. A felvett szignál egy eddig ismeretlen gén expresszióját stimulálja, melynek hatására képződő 2. szignál felvételében, felismerésében illetve a 3. szignál termelésében az egy komplementációs csoportba tartozó *bldA* és *bldH* gének játszanak szerepet. A *bldA* gén terméke egy leucint szállító tRNS^{Leu}_{UUA}. A leucin UUA kodonja nagyon ritkán fordul elő a 70-75% G+C tartalmú *Streptomyces* mRNS-ben, mely alapján feltételezhető, hogy a *bldA* gén szerepet játszik a leucint kódoló TTA tripletet tartalmazó gének expressziójának szabályozásában. A 3. és 4. szignál között a vegetatív micéliumban eddig a transzkripció faktorokkal kölcsönható fehérje osztályba tartozó *bldG*, a 4. és az 5. szignál között pedig a *bldC* gént azonosították (Willey és mtsai., 1993). Az 5. szignál hatására expresszáló *bldD* gén valószínűleg a mintegy 2 kD molsúlyú SapB szintézisét végző peptid szintetáz struktúrgénjének átírását indukáló transzkripció faktor-szerű fehérje (3. ábra). A 18 aminosavból álló SapB peptid (Willey és mtsai., 1991). tehát közvetlenül nem DNS által kódolt és nem riboszómán szintetizálódik. Az ismert *bld* gének túlnyomó többsége (*bldA*, *bldB*, *bldD*, *bldH*) pleiotróp hatású, ami abban nyilvánul meg, hogy az életciklus szabályozásán túl a szekunder metabolitok, így például az antibiotikumok termelésében is szerepet játszanak (Merrick, 1976; Chater, 1993). A SapB csak komplett táptalajon szükséges a légmicélium képzéshez, a szénforrásként nem glükózt tartalmazó minimál táptalajon növe, teljes morfológiai differenciálódáson keresztül menő telepekben a SapB detektálható mennyiségben nem fordul elő (Guijarro és mtsai., 1988).



3. ábra *S. coelicolor* A3(2) bld génjei és az extracelluláris szignáltranszdukciós rendszerben elfoglalt helyük (Chater, 1998).

Az itt ismertetett, részleteiben még nem teljesen ismert, ezért feltehetőleg túlegyszerűsített regulációs kaszkádon kívül működnek még a *Streptomyces* túlélése szempontjából fontos légmicélium képzésében és a vizes fázisból való kiemelkedésének segítésében szerepet játszó további szabályozási útvonalak. Az általunk tanulmányozott *Streptomyces griseus*ban ismertek olyan kis molekulák, mint például az A faktor, illetve fehérjék, úgymint a dolgozatomban tárgyalt és az intézetünkben azonosított C faktor; melyek bizonyítottan regulálják a légmicélium formálódását.

2.2.2. Az A faktor által szabályozott regulációs kaszkád modellje

Az A faktor (Khokhlov, 1967) kémiai természetét tekintve egy γ -butyrolakton gyűrűt tartalmazó molekula, mely mind a streptomycin termelést, mind pedig a légmicélium képzést már 10^{-9} M koncentrációban indukálja (Hara és mtsai., 1982). Ez a nagyon alacsony koncentrációban kifejtett pleiotróp hatás speciális receptor fehérje jelenlétét feltételezi. A szubsztrát micéliumban termelődő A faktor a harántfalakat igen ritkán tartalmazó hifában diffúzióval annak minden részébe eljut és ami még fontosabb, hogy szignál molekulaként részt vesz az egymáshoz közel fekvő szubsztrát micéliumok közötti kommunikációban, összehangolva a légmicélium képzés folyamatát. Az A faktor bioszintézis kulcsenzimét kódoló *afsA* gén *Streptomyces griseus*ban a lineáris kromoszóma egyik végi részén helyezkedik el, ami 1 %-os gyakorisággal spontán A-faktor hiányos

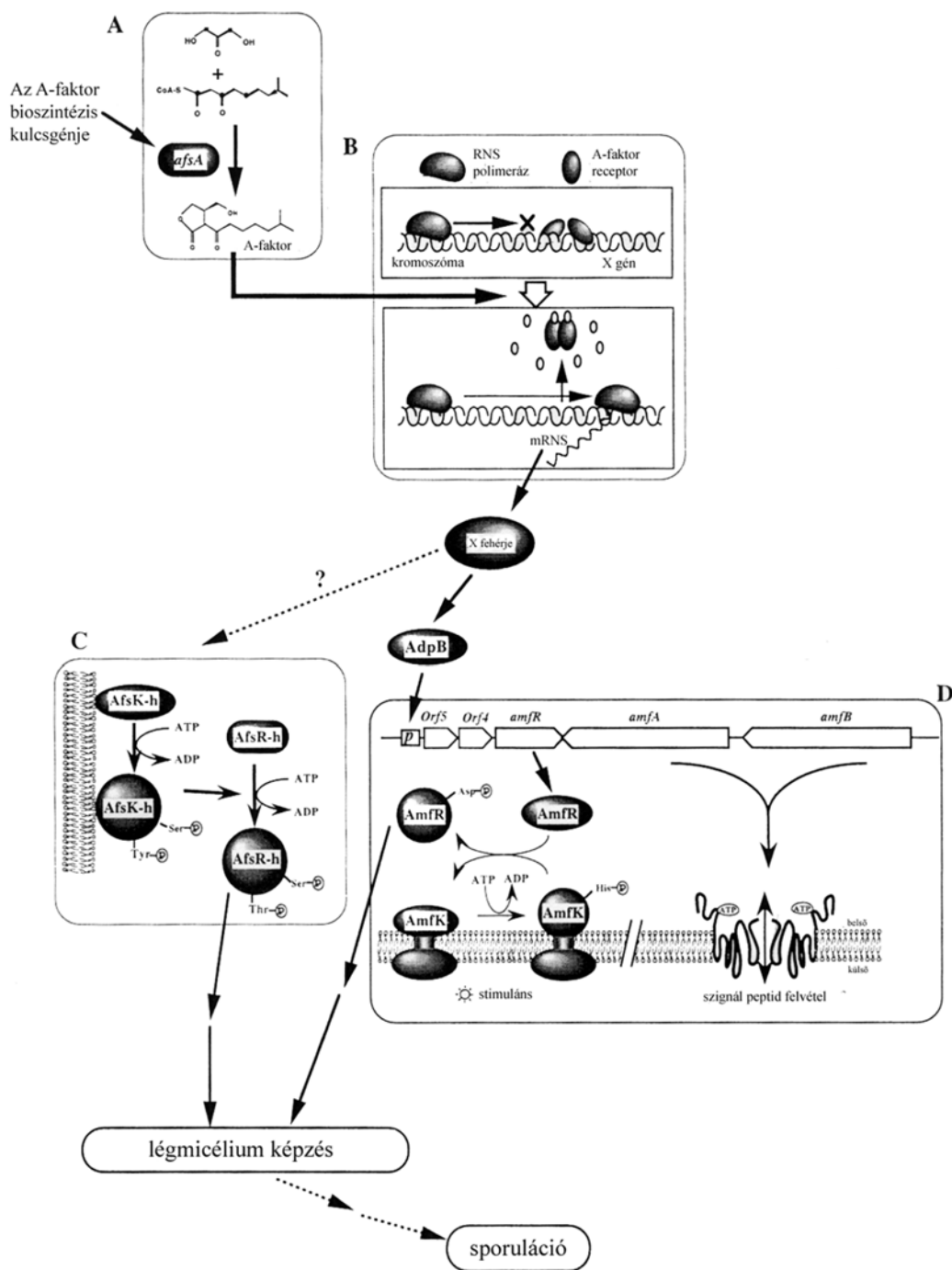
mutáns törzsek képződését eredményezi (Lezhava és mtsai., 1997). Az A faktor molekula a vegetatív szakaszt jellemző kvázi-exponenciális növekedés végéig a tenyészet sűrűsödésével fokozatosan akkumulálódik. Mivel a sejtmembránon könnyen átjut a sejten kívüli térbe, onnan pedig a szomszédos micélium sejtjeibe szabadon diffundálhat, az intracelluláris koncentrációja közel azonos az extracelluláris koncentrációjával. A légmicélium képzést, illetve antibiotikum termelést szabályozó regulációs kaszkádok működését akkor kapcsolja be, mikor sejten belüli koncentrációja eléri a kb. 32 nM-os értéket. A szubsztrát micélium citoplazmájában található ArpA receptor fehérje (Miyake és mtsai., 1989) nagyfokú érzékenysége, 0,7 nM-os disszociációs állandója (K_d), hasonló az eukarióta hormon receptorok paramétereire (Miyake és mtsai., 1989). Az A faktort ebből kifolyólag mikrobiális hormonnak szokás nevezni (Horinouchi és Beppu, 1992). Az ArpA receptor fehérje C terminális doménjéhez kötődik az A faktor, míg N-terminális részén α -helix-turn- α -helix DNS-kötő motívum található. A vegetatív életciklus korai szakaszától termelődő receptor fehérje A faktor hiányában homodimer formában (Onaka és mtsai., 1995) DNS-kötő doménjével a légmicélium formálódását reguláló kaszkád eddig még nem azonosított génjéhez kötődik represszor típusú regulátorként hatva. Amint az A faktor koncentrációja 32-160 nM közötti értékű, a receptor már nem képes génexpresszió gátlásra, mivel a homodimerhez kötődő A faktor megváltoztatja az ArpA fehérje konformációját, minek következtében az ledisszociál a DNS-ről (Horinouchi, 1996; Horinouchi, 1999).

A légmicélium formálásában a regulációs kaszkád fontos tagja az *amfR* gén terméke, mely a prokariótákra jellemző két-komponensű válasz-regulátor fehérjékkel mutat homológiát. A válasz-regulátor fehérjékhez hasonlóan foszforilálódik, mégpedig az N-terminális doménjében lévő Asp-54-en. Az AmfK fehérjét, a feltételezett szenzor hisztidin kinázt eddig még nem sikerült azonosítani, sőt feltételezhető, hogy a foszfortranszfer rendszer több komponensből áll. Az AmfR foszforilált, aktív formája transzkripció aktivátorként funkcionálhat. Az AmfR C-terminálisán egy α -helix-turn- α -helix DNS-kötő motívum található, ami igazolni látszik a feltételezett szerepet. Az *amfR* promótere nem közvetlenül a gén előtt helyezkedik el, közöttük még két további nyitott leolvasási keret (ORF4, ORF5) található. Promótere A faktor szignál hiányában represszált állapotban van. A represszor szerepét a promóter régióhoz kötődő AdpB fehérje tölti be. Az még nem tisztázott, hogy az A faktor az *adpB* transzkripcióját gátolja vagy pedig egy a szignál

hatására termelődő enzim az AdpB fehérjét inaktiválja (4. ábra). Az *amfR* gén szekvenciájában található, leucint kódoló TTA bázishármas arra utal, hogy a gén átíródását az A faktor kontrollja mellett valószínűleg a *bldA* gén is szabályozza (Ueda és mtsai., 1998; Horinouchi, 1996).

A foszfortranszfer működéséhez, felépítéséhez visszakanyarodva említést érdemel a *Bacillus subtilis*ben működő SpoOK transzport rendszer, melynek a sporuláció iniciálásában van szerepe. A rendszernek a sejt külső membránjához kapcsolódó eleme egy szubsztrát kötő protein, míg a megkötött szubsztrát felvételében két membrán-integrált fehérje vesz részt. A folyamat ATP igényes, melyhez két ATP-áz működése szolgáltatja a szükséges energiát. A SpoOK transzport rendszer extracelluláris peptid szignálok érzékelésével és sejtbe való felvételével foszfokinázok (pl. KinA) aktiválásán keresztül válasz regulátorokat foszforilál, melyek transzkripciós faktorként a sporulációban fontos gének átírását indukálják (Perego és mtsai., 1991; Rudner és mtsai., 1991).

Hasonló rendszer valószínűleg *Streptomyces*ekben is működik. *Streptomyces griseus*ban az *amfR* génnel ellentétes orientáltságú *amfA* illetve az azt követő *amfB* gén terméke a membránban integráns fehérjeként valószínűleg homodimert alkot (Horinouchi, 1996). Transzmembrán régiójuk az N-terminális részükön található, míg a citoplazmatikus tér felé néző C-terminális szakaszuk egy igen konzervált ATP-kötő domént tartalmaz (Blight és Holland, 1990). Az AmfA-AmfB fehérjék által alkotott póruson felvételre kerülő fehérjét, illetve oligopeptidet- mely hatására indukálódott foszforilációs folyamatok eredményeképpen az AmfR fehérje foszforilálódik - eddig még nem sikerült azonosítani (4. ábra). Egy lehetséges jelöltként felvetődött a C faktor is (Horinouchi, 1996).



4. ábra Az A faktor által szabályozott légmicélium képzés feltételezett modellje *S. griseus*ban (Horinouchi, 1996).

2.2.3. A C faktor kutatás előzményei

A C faktor fehérje azonosítása a *S. griseus* 45H 66-72 órás fermentlevéből történt, mely törzs mind szilárd, mind folyékony tenyészetben egyaránt teljes életciklussal rendelkezik. A C faktor hatás tesztelésére kiválasztott *S. griseus* 52-1 differenciálódása folyékony tenyészetben elakad, sem reproduktív hifafonalakat, sem spórát nem képez. Amennyiben a C faktort ezen életciklusában elakadt törzs tenyészetéhez adjuk, annak reproduktív típusú differenciálódását váltja ki (Szabó és mtsai., 1962). A C faktor hatás specifikusságára utal, hogy a tesztrendszerben a 20 óránál fiatalabb tenyészethez adott fehérje már 1 ng ml^{-1} koncentrációban kiváltja a jellegzetes biológiai hatást, ami az A faktorhoz hasonlóan specifikus receptor jelenlétét feltételezi. A C faktor fehérje természetű, tisztítását ioncserélő kromatográfiás eljárások és DNS agaróz affinitáskromatográfia kombinációjával sikerült megoldani. Molekulatömege SDS gélelektroforézissel 34000 Daltonnak adódott (Bíró és mtsai., 1980). A tiszta fehérje birtokában előállított poliklonális szérum, illetve monoklonális antitest lehetővé tette a C faktor kimutatását ELISA módszerrel különböző *Streptomyces* törzsekben (Szeszák és mtsai., 1990). A C faktor, vagy legalábbis egy olyan fehérje, mely a C faktor ellen termeltetett monoklonális antitesttel keresztreagál, minden vizsgált *Streptomyces* törzsben, mind a fermentlében, mind pedig sejthez kötötten a micéliumban kimutatható volt (Szabó és mtsai., 1988). A keresztreagáló fehérje molekulatömege minden esetben 34 kDa-nak vagy mintegy duplájának, 70 kDa-nak adódott. Ez az eredmény, a C faktornak a *Streptomycesek* közötti széles elterjedésére vonatkozólag, mint dolgozatomból kiderül, Southern-hibridizációval nem nyert megerősítést. ELISA technikával sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy a tesztörzshöz hozzáadott C faktor fehérje viszonylag rövid időn belül eltűnik a tápfolyadékából, majd 48-60 óras korban ismét megjelenik a hozzáadottnál lényegesen nagyobb koncentrációban. A C faktor biológiai hatása Zn-ionnal fokozható, a fehérje Zn-affinitás kromatográfiás oszlopon tisztítható, s ezzel a módszerrel sikerült a legjobb specifikus aktivitású preparátumot előállítani (Szeszák és mtsai., 1997). Az intézetünkben azonosított C faktor volt az első *Streptomycesek*ben azonosított differenciálódásra ható fehérje természetű autoregulátor.

2.2.4. Az AmfC illetve az Orf1590 fehérje, mint az A faktor mutáció szupresszora

*Streptomyces griseus*ban a légmicélium képzés szabályozásában betöltött szerepe alapján említést érdemel még az AmfC és az Orf1590 fehérje. A 218 aminosavat kódoló *amfC* gén magas kópiaszámú plazmidról expresszáltatva az A faktor hiányos mutáns *S. griseus* HH1 törzsben helyreállítja annak légmicélium és spóra képzését, úgy, hogy magát az A faktor termelést nem befolyásolja (Kudo és mtsai., 1995). A gén homológját *S. coelicolor*ban is megtalálták. Az *amfC* gén terméke csak a morfológiai differenciálódás tekintetében működik szupresszorként, a szekunder metabolizmus regulációjára nincs hatással.

Az *orf1590* gén transzkripciója két különböző promóterről történhet. A P1 promóterről egy 56 kDa (P56), míg a P2 promóterről egy kisebb 49,5 kDa (P49,5) tömegű fehérje képződhet (McCue, 1992). A hosszabb fehérje N-terminálisán egy DNS kötő α -helix-turn- α -helix motívum található, ettől a különbségtől eltekintve azonban a két fehérje szekvenciája azonos. Az *orf1590* gén fontos jellemzője a TTA kodon jelenléte, ami arra utal, hogy transzkripciója *bldA* dependens (Babcock és Kendrick, 1990). A vegetatív növekedés során mindkét transzkriptum azonos mennyiségben akkumulálódik a micéliumban, a képződő P56 és P49,5 fehérje pedig heterodimert alkot. A sporuláció során a rövidebb transzkriptum már erősen csökkent mennyiségben van jelen. A hosszabb polipeptid viszont homodimert képezve aktiválódik, mely aktív forma DNS kötő tulajdonságú (McCue és mtsai., 1996). Az *orf1590* gén képes visszaállítani az A faktor illetve *amfC* null mutáns légmicélium képzését az eredeti szintre (Kudo és mtsai., 1995). A fentebb említett *amfRAB* géncsoport szintén szupresszálja az A faktor illetve *amfC* mutációt, bár a képződött légmicélium a második esetben gyakran lizál. Még nem ismert, hogy az itt leírt két gén az A faktor által aktivált regulációs kaszkád tagja-e vagy egy ettől különböző, de ezzel kapcsolódó szabályozási rendszerhez tartoznak.

2.2.5. Spóráképzésben résztvevő *whi* gének *S. coelicolor*ban

A légmicélium növekedés befejezését és a spóra képzésének illetve érésének folyamatát szabályozó gének a pigmentált spórát nem képző *whi* mutánsok tanulmányozásán keresztül *S. coelicolor*ban a legismertebbek. A mutánsok megjelenési formája alapján korai (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI*, *whiJ*) és késői (*whiD*, *whiE*)

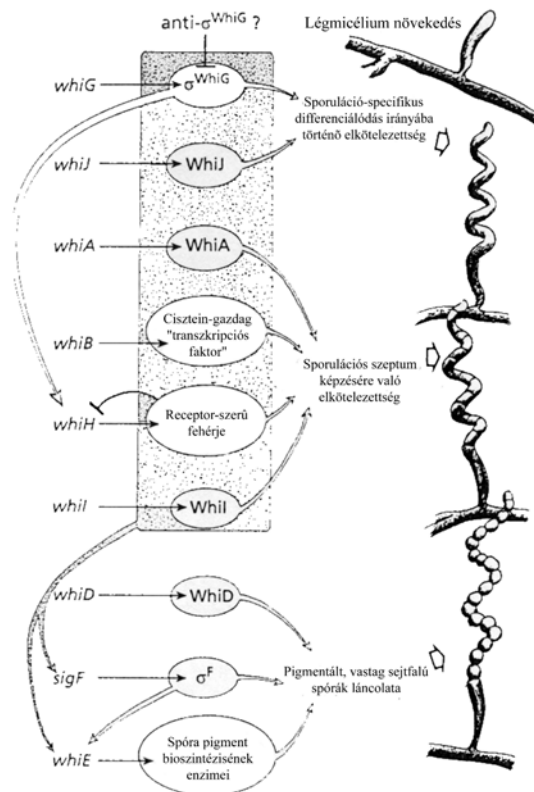
sporulációs géneket lehet megkülönböztetni (Molle és mtsai., 2000). A sporuláció irányába történő elkötelezettség felé két fontos döntési ponton keresztül vezet az út. A sporuláció iniciálásában kritikus faktor a *whiG* által kódolt szigma-faktor hifán belüli koncentrációja, ez egyben az első döntési pontnak felel meg. A *whiG* transzkripciója többé-kevésbé azonos szintű az egész életciklus alatt. Mivel a vegetatív szakaszban nem játszik szerepet, feltételezhető, hogy aktiválása más baktériumok σ faktoraival való homológia alapján az ezeknél ismert módon anti- σ faktor útján történik (Chater, 1998). A *whiG* mutánsok légmicéliuma egyenes, szeptum alig található benne, mely felépítése alapján tipikus, vegetatív micéliumra jellemző harántfal. A σ^{whiG} RNS polimeráz valószínűleg a sejtfa szerkezetét befolyásoló géneket írja át, a hifa csúcsi részének spirális növekedése felehetőleg a σ^{whiG} RNS polimeráz aktív formájának kialakulása után nem sokkal indul el. Más, szintén *whiG* dependens gén pedig glicin-betain kötő fehérjét kódol, mely a légmicélium csúcsi részének a szubsztrát micéliumra merőleges növekedéséhez szükséges megfelelő turgor nyomáshoz járul hozzá (Flärth és mtsai., 1999). Az egyre fokozódó csúcsi növekedés következtében a szubsztrát micéliumból pótlódó tápanyag mennyisége folyamatosan csökken, ami szükségessé teszi a sejtfa növekedés és a replikáció leállítását.

A sporuláció irányába történő differenciálódás második fontos döntési pontjában a *whiA*, *whiB* gének által irányított folyamatok állnak. A *whiA* illetve *whiB* mutánsokban sporulációs szeptum képződés nincs, a nukleoid szegregáció és kondenzáció folyamata még nem kezdődött el, abnormális hosszúságú, de már spirális csúcsi részű légmicéliumot fejlesztenek. A *whiB* átírása független a *whiG* géntől, citoplazmában található fehérje terméke kb. 80-120 aminosavból áll. A *whiB* jellegzetessége a négy kondenzált cisztein aminosava, melyek jelenléte alapján feltételezhető, hogy a fehérje érzékeny a citoplazmatikus redox állapot változásaira, talán egy, a ciszteinek által kötött fématomon keresztül vagy inter- illetve intramolekuláris diszulfid hidak képzése révén. A WhiB másik jellegzetessége a C terminális részén található α -helix-turn- α -helix struktúra. A felállított hipotézis szerint a WhiB egy transzkripciós faktor, mely a környezeti vagy a hifán belüli, a differenciáltsági fokot tükröző metabolikus változásokból eredő redox változásokat érzékelve különböző gének átírását aktiválja (Soliveri és mtsai., 2000; Ainsa és mtsai., 2000). A kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy a *whiA* és *whiB* sokkal inkább a

légmicélium növekedésének illetve a replikáció folyamatának a leállításában vesz részt, mint a sporulációs harántfal képzésében.

A sporulációs szeptum kialakításában a WhiH és a WhiI fehérje vesz részt (Chater, 2000). Mutánsaik légmicéliuma spirális lefutású és hossza többé-kevésbé megegyezik a vad típuséval, a hifákban harántfal csak igen ritkán képződik (Flärth és mtsai., 1999). Mindkét fehérje génjének átírása teljesen a *whiG* géntől függ. A WhiH valószínűleg a sporulációs szeptum képzést és a DNS egyenletes sejtenkénti eloszlását irányítja. A WhiH képes represszálni bizonyos gének promóterét, mely represszió a szén-metabolizmus karboxilát tartalmú köztes termékeinek koncentráció emelkedésével szűnik meg. Lehetséges, hogy a WhiH fehérjének van egy transzkripciós aktivátorként illetve egy represszorként működő része (Chater, 1998). Ez a stádium információs cserepontnak tekinthető a σ^{whiG} RNS polimeráz által átírt gének közreműködésével irányított és az attól független *whiB* génnel fémjelzett regulációs folyamatok között.

A sporuláció későbbi stádiumában fontos gének átírásában egy másik szigma faktorról, a σ^{F} -el kiegészült RNS polimeráz vesz részt. A σ^{F} faktort kódoló gén nem kerül addig transzkripcióra, míg a sporulációs harántfalak által határolt sejtek képzése a légmicéliumban be nem fejeződött. Késői sporulációs gén a *whiD* és a *whiE*. A WhiD ugyanabba a fehérje családba tartozik, mint a WhiB, tehát aktiválásában szintén a redox állapot változásának van szerepe. A *whiD* mutánsok képeznek sporulációs harántfalat, de a spóra érési folyamata elmarad. A spórák sejtfala vékony, könnyen lizálnak és nem pigmentáltak. A két folyamat közül a WhiD a sejtfal vastagodását és a lekerekített spóra alak kialakítását irányítja (Molle és mtsai., 2000). A *whiE* gén terméke pedig a spóra pigmentáltságát biztosítja (5. ábra).



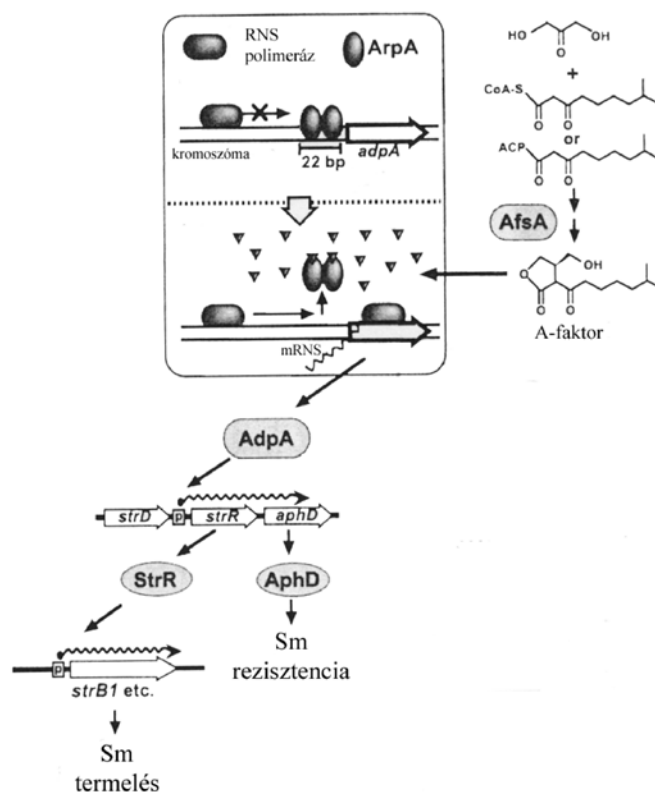
5. ábra A *whi* gének sporulációban betöltött szerepe *S. coelicolor*ban A3(2) (Chater, 1998).

A légmicélium illetve a spóráképzés lépéseit áttekintve megállapítható, hogy mindkét folyamat többszörösen szabályozott, irányításukban több, egymással kapcsolódó regulációs kaszkád vesz részt. A differenciálódás egymást követő állomásait nézve azt mondhatjuk, hogy a légmicélium és a spóráképzés egymásra épül, tehát légmicélium nélkül nem fejlődhetnek spórák. A *Streptomycesek* tanulmányozása során ezzel ellentmondóan írtak le olyan mutáns törzseket, mint például az A faktor mutáns *S. griseus* HH1, melyek szilárd táptalajon légmicélium képzése nélkül spórázni képesek (Kendrik és Ensign, 1983; Szabó és Vitális, 1992). A spórák ebben az esetben a szubsztrát micéliumban képződnek, a spórákat tagoló szeptum is tipikus, a légmicéliumokra jellemző sporulációs harántfal. E jelenség arra enged következtetni, hogy a légmicélium hiánya nem feltétlenül blokkolja a spóráképzés folyamatát.

2.3. Streptomycin antibiotikum termelés szabályozása *S. griseus*ban

A légmicélium képzéssel jellemzett morfológiai differenciálódással párhuzamosan történik a szekunder metabolitok, ezen belül pedig az antibiotikumok termelése. Folyékony tenyészetben az antibiotikum termelés a kvázi-exponenciális növekedés befejeztével kezdődik. *S. griseus*ban a streptomycin bioszintézist az A faktor szabályozza. Az antibiotikum szintézis bekapcsolásában fontos kulcsgén az *adpA*, melynek átírását vegetatív életciklusban a hozzákötődő ArpA receptor fehérje gátolja (Ohnishi, 1999). Amint az A faktor koncentrációja eléri a 32 nM-os küszöbértéket, receptorához kötődve megszünteti annak represzáló hatását, miután a receptor-A faktor komplex ledisszociált az *adpA* génről. A folyamat következő lépéseként átírásra kerül a transzkripciós aktivátort kódoló *adpA* gén. A kaszkád az AdpA fehérje által stimulált *strR* gén transzkripciójával folytatódik, melynek fehérje terméke a streptomycin bioszintetikus útra specifikus transzkripciós aktivátor (6. ábra). Az StrR a glükózból kiinduló streptomycin bioszintézisben résztvevő valamennyi gén átírását aktiválja (Horinouchi, 1999).

A *Streptomyces*ek között gyakran előfordul, hogy egy adott törzs többféle antibiotikumot is képes termelni. Így például *S. coelicolor*ban három szerkezetileg eltérő antibiotikum bioszintéziséhez a kromoszómán három egymástól jól szeparált géncsoport található. Ebben a törzsben a szekunder metabolitok termelésének szabályozásában fontos szerepet játszik az AfsK/AfsR szignál transzdukciós rendszer. A gének nagyfokú homológjai *S. griseus*ban is megtalálhatóak, de itt nem befolyásolják az antibiotikum bioszintézist, csak a légmicélium képzésére vannak hatással glükóz tartalmú táptalajon (4. ábra). Feltételezhetően mindkét törzsben a tápanyagellátottság szintjének változását érzékelve az AfsK szerin és threonin aminosavainak autofoszforilálásán keresztül kináz aktivitását indukálja. Az aktivált kináz a szignált az AfsR fehérjének továbbítja azt foszforilálva. A foszforilálódott AfsR *S. coelicolor*ban a szekunder metabolitok termeléséhez, míg *S. griseus*ban a légmicélium képzéshez szükséges gének átírását fogja indukálni. *S. griseus*ban az AfsK/AfsR szignál-transzdukciós rendszer csak az A faktor megfelelő koncentrációban való jelenléte után kapcsol be (Umeyama és mtsai., 1999).



6. ábra A streptomycin termelés regulációs kaszkádja *S. griseus*ban (Horinouchi, 1999).

A fent leírtak alapján látható, hogy a légmicélium képzés és az antibiotikum termelés egymással összefüggő folyamatok, szabályozásukban vannak közös pontok. Az egyes gének regulációban betöltött szerepére viszont nehéz általános jellemzést adni, mivel még nagyfokú homológia esetén is egy adott gén különböző *Streptomyces* törzsekben eltérő funkciójú lehet.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A kísérletek során felhasznált törzsek

3.1.1. Streptomyces törzsek:

<i>S. griseus</i> 45H	Szabó és mtsai., 1961
<i>S. griseus</i> 52-1	Szabó és mtsai., 1961
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ (Hopwood és mtsai., 1985)
<i>S. coelicolor</i> M512	$\Delta red\Delta actII$ -ORF4 (Floriano és mtsai., 1996)
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	vad (Kendrick és mtsai., 1983)
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFN	<i>bald</i> mutáns (Penyige A, nem közölt eredmény)
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFP	<i>bald</i> mutáns (Penyige A, nem közölt eredmény)
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585	vad
<i>S. parvulus</i> 3677	vad
<i>S. griseoviridis</i> NRRL 2427	vad
<i>S. albus</i> 391	vad
<i>S. albus</i> R-55	vad
<i>S. griseobrunneus</i> 752	vad
<i>S. flavofungini</i> 147	vad
<i>S. lividans</i> 66	vad
(John Innes stock No. 1326)	
<i>S. fradiae</i> LN 47	vad

3.1.2. *E. coli* törzsek:

<i>E. coli</i> JM109	<i>recA</i> <i>supE44</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) (Yanish-Perron és mtsai., 1985)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA46</i> <i>thi</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> ⁻ F' { <i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15Tn10 (<i>tet</i> ^r)} (Bullock és mtsai., 1987)
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam13::Tn9</i> <i>dcm6</i> <i>hsdM</i> <i>hsdR</i> <i>zjj201::Tn10</i> <i>galK2</i> <i>galT22</i> <i>ara14</i> <i>lacY1</i> <i>xyl5</i> <i>leuB6</i> <i>thi1</i> <i>tonA3</i> <i>rpsL136</i> <i>hisG4</i> <i>tsx78</i> <i>mtli</i> <i>glnV44</i> F ⁻ (MacNeil és mtsai., 1992)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Grant és mtsai., 1990)
<i>E. coli</i> M15(pREP4)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ (Quiagen)

3.2. Táptalajok

A táptalajok receptje 1 literre vonatkozik. Az itt közölt recepteket, ha más szerző nincs feltüntetve, egyrészt a Genetic Manipulation of Streptomyces (Hopwood és mtsai., 1985), másrészt pedig a Practical Streptomyces Genetics (Kieser és mtsai., 2000) kézikönyvből vettük.

3.2.1. Streptomyces törzsek tenyésztésére használt folyékony táptalajok

YEME (yeast extract, malt extract)

yeast extract	3 g
Bacto-pepton	5 g
malt extract	3 g
glükóz	10 g
szaharóz	340 g
autoklávozás után kiegészítendő	
MgCl ₂ x6H ₂ O (2,5 M)	2 ml liter ⁻¹

HMM (yeast extract, malt extract, maltóz)

yeast extract	5 g
malt extract	5 g
maltóz	5 g

TSBS (Trypton, soya broth)

tripton	17 g
szója pepton	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
glükóz	2,5 g
szacharóz	100 g

Pufferezett szűrt szójas táptalaj (Szabó és mtsai. 1961)

kukorica lekvár	6 g
szójaliszt	20 g
NaCl	3 g
CaCO ₃	2 g
deszt. víz	900 ml
5%-os MgSO ₄	10 ml
nyomelem oldat I	10 ml

60 perc főzés Koch fazékban, pH beállítása 7,8-8.0 közé.

Oldhatatlan maradék kiszűrése géz közé csomagolt 4-5 papírvatta rétegen keresztül. Hígítás azonos térfogatú (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) pH 7,5 M/15 foszfát pufferrel. Sterilizés autoklávban. Felhasználás előtt 9 rész táptalajhoz 1 rész 20 %-os glükóz oldatot adni.

Nyomelem oldat I (1 literre vonatkoztatva)

CuSO ₄ x5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,15 g
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,2 g

Minimál táptalaj

NMMP

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Casaminosav	5 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,6 g
PEG 6000	50 g
Nyomelem oldat II	1 ml
deszt. víz	800 ml

80 ml-es részletekben szétmérés.

Felhasználáskor kiegészíteni (80 ml-re vonatkoztatva):

NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ puffer (0.1 M, pH 6.8)	15 ml
szénforrás (20 %)	2,5 ml
növekedési faktor	2,5 ml

Nyomelem oldat II (1 literre vonatkoztatva)

ZnSO ₄ x7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ x7H ₂ O	1 g
MnCl ₂ x4H ₂ O	1 g
CaCl ₂ nem hidratált	1 g

3.2.2. *Streptomyces* törzsek tenyésztésére használt szilárd táptalajok

Minden esetben 2,2 g agart adtunk 100 ml táptalajhoz.

R2YE (R5)

szacharóz	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x6H ₂ O	10,12 g
Glükóz	10 g
Casaminosav	0,1 g
Nyomelem oldat	2 ml
yeast extract	5 g
TES puffer	5,73 g

Felhasználás előtt 100 ml táptalajt kiegészíteni az alábbi komponensekkel:

KH ₂ PO ₄ (0,5 %)	1 ml
CaCl ₂ .H ₂ O (5 M)	0,4 ml
L-prolin (20 %)	1,5 ml
NaOH (1 N)	0,7 ml

Szűrt szójas agar-táptalaj

A pufferezett szűrt szójas táptalajnál felsorolt komponenseken túl az agar mellett még 20 g glükózt kell oldani 1000 ml deszt. vízben a Koch- fazékban való főzés előtt. A további lépések megegyeznek.

3.2.3. Streptomycesek protoplasztálásához használt táptalaj

A YEME táptalajt ki kell egészíteni 25 ml 20 %-os glicinnel.

A transzformálás során használt P(protoplasztáló)-puffer

Bemérések 800 ml-hez

szaharóz	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x6H ₂ O	2,02 g
nyomelem oldat III	2 ml

Autoklávozás után kiegészítendő az alábbi oldatokkal (80 ml-hez):

KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1 ml
CaCl ₂ x2H ₂ O (3,68 %)	10 ml
TES puffer (5,73 % pH 7,2)	10 ml

Nyomelem oldat III (1 literhez)

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ x6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ x4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ x10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x4H ₂ O	10 mg

3.2.4. *E. coli* törzsek tenyésztésére használt táptalaj

L Broth

tripton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g
glükóz	1 g

LB agar

100 ml L Broth-hoz 1,5 g agart adunk.

3.2.5. Titráló táptalaj antibiotikum koncentráció meghatározásához

húskivonat	5 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
pepton	0,5 g

A komponenseket 100 ml deszt. vízben 2 percig forralni kell, majd a pH 8.0-ra történő beállítása után az oldatot szűrőpapíron szűrni. A szűrletet ki kell egészíteni 900 ml deszt. vízzel és 15 g agarral. Sterilizés után a pH-t ellenőrizni kell: pH 7,6-7,8 között kell lennie.

3.2.6. *Streptomycesek* tenyésztési körülményei

A törzsek tenyésztése folyékony táptalajon 300 ill. 500 ml-es, acélspirált tartalmazó Erlenmeyer lombikokban, 30 °C-on, 250 ford/perc frekvenciájú körkörös sikrázógépen történt. A táptalajt spóraszuszpenzióval, kopasz mutáns esetén pedig micéliummal inokuláltuk. Az acélspirál a tenyészet jó levegőzését biztosítja, s mechanikai hatásánál fogva pedig homogénebb tenyészetet eredményez

Szilárd táptalajon a kiszélesztett spóraszuszpenzióból ill. micéliumból (kopasz mutáns) induló tenyésztés 30 °C-os termosztátban történt.

3.3. Molekuláris biológiai módszerek

3.3.1. A kísérletek során felhasznált vektorok

- pUC19 (Yanish-Perron és mtsai., 1985). *E. coli*ban replikálódik. A *lacZ* gén egy rövid szakaszát hordozza, melyről a β -galaktozidáz amino-terminális része fejeződik ki. A defektes β -galaktozidáz gént hordozó F' plazmidot tartalmazó baktérium törzsbe transzformálva (pl. XL1-Blue) a *lac*-operonon alapuló kék-fehér szelekcióra használható. Ampicillin rezisztencia gént hordoz.
- pBluescript II KS+ (Short és mtsai., 1988). A pUC19-es vektorból származik. A fent leírtak jellemzőek rá. Eltérés van a poliklónozó hely restriktions hasítóhelyeiben, illetve a ploniklónozó helyet ebben az esetben az egymással szembe mutató T3 és T7 promóter fogja közre. A két promóter a hozzájuk tartozó primereken keresztül felhasználható a klónozott gén vagy génszakasz szekvenálására.
- pIJ2925 (Janssen és Bibb, 1993). A pUC19-es vektorból származik, ploniklónozó helye néhány restriktions hasítóhelyben eltér és *Bgl*III hasítóhelyek fogják közre. A pUC19 plazmidnál leírtak jellemzőek rá.
- pSP72 (Promega) *E. coli*ban replikálódik. A plazmid két szálán az SP6 vagy a T7 promóterről *in vitro* transzkripció indukálható. A vektor szelekciós markere az ampicillin rezisztencia gén.
- pIJ702 (Katz és mtsai., 1983). *Streptomyces*ekben replikálódó magas kópiaszámú (300-400/sejt) plazmid. Thiostrepton rezisztencia gént hordoz. Másik marker génje a melanin operonhoz tartozó *melC1*.
- pHJL401 (Larson és Herschberger 1986). A plazmid rendelkezik a pUC19 és a *Streptomyces* törzsekben fenntartható SCP2 vektor replikációs origójával. *E. coli*/*Streptomyces* ingázó, alacsony kópiaszámú vektor. *Streptomyces*ekben 10 példány jut 1 kromoszómára. Ampicillin és thiostrepton rezisztencia géneket tartalmaz.
- pWHM3 (Vara és mtsai., 1989). A plazmid a pUC19 és a pIJ486 plazmid replikációs origóját tartalmazza. *E. coli*/*Streptomyces* ingázó, magas kópiaszámú vektor. *Streptomyces*ekben 100 példány jut egy kromoszómára. Ampicillin és thiostrepton rezisztencia géneket tartalmaz.

- pIJ2587 (van Wezel és mtsai., 2000). Replikációs origói és rezisztencia markerei a pHJL401 ingázó vektorból származnak. A pIJ4114 plazmidből (J. White, nem közölt eredmény) eredő promóter nélküli *redD* kazettát két terminátor fogja közre- a methylenomycin rezisztencia gén és egy fág terminátora, melyek biztosítják, hogy a *redD* transzkripciója csak az elé klónozott promoterről történhessen.
- PQE70 (Qiagen) *E. coliban* replikálódó expressziós vektor. A kifejezteni kívánt gén klónozása a T5 fág promóter és az azt követő két *lac* operátor régió mögé történik. A két operátor fokozza a bekötődő *lac* represszor fehérje mennyiségét és így biztosított, hogy indukció nélkül nem kezdődik átírás a promoterről. A vektoron ampicillin rezisztencia gén található.

3.3.2. *Streptomyces* kromoszómális DNS izolálás

1. 25 ml YEME táptalajon növesztett tenyészet lecentrifugálása után a micéliumot 3 ml lizozim oldatban felfuszpendáltuk (2 mg ml⁻¹ lizozim, 0,3 M szaharóz, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0), 37 °C-on 10 percig inkubáltuk.
2. 4 ml “2 x Kirby” mix (1 % Na-tri-izopropilnaftalén szulfonát, 6 % Na-4-amino szalicilát, 6 % fenol:kloroform (1:1) pH 7.0; 50 mM Tris-HCl pH 8.3) hozzáadása után 1 percig kémcsőrázóval kevertettük.
3. 8 ml fenol/kloroform (50 ml fenol, 50 ml kloroform, 1 ml iso-amyl alkohol) oldattal kiegészítve 15 másodpercig kémcsőrázóval kevertettük ezt követően pedig lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
4. A felső vizes fázist új Eppendorf csőbe átvittük, 3 ml fenol/kloroform oldattal kiegészítettük és a 3. pont szerint rázattuk és lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
5. A felső vizes fázist új Eppendorf csőbe átvittük, 1/10 térfogat 3 M Na-acetát pH 6.0 és azonos térfogatú izopropanol hozzáadása után 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc), a felülúszót leöntöttük.
6. A csapadékhoz 7 ml abszolút alkoholt hozzámértünk, majd 10 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
7. A csapadék 5 ml TE pufferben való feloldása után RNáz-zal (40 µg ml⁻¹) 37 °C-on 30 percig kezeltük.

8. 1,5 ml fenol/kloroform oldatot hozzáadva kevertettük és centrifugáltuk a 4. lépés szerint.
9. A kromoszómális DNS-t izopropanollal kicsaptuk, abszolút alkohollal mostuk az 5. és 6. lépés szerint.
10. A csapadékot 1-2 ml TE-ben feloldottuk.

3.3.3. Plazmid izolálás *Streptomyces*ekből alkalikus lízissel

1. 2 g lecentrifugált micéliumot 5 ml lizozim oldatban (2 mg ml⁻¹ lizozim 0,3 M szaharóz, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0) felfuszpendáltunk, majd pedig 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.
2. 2,5 ml 0,3 M SDS oldatot hozzáadtunk és pipettával összekevertük.
3. 70 °C-on 20 percig inkubáltuk, majd fokozatosan szobahőmérsékletre lehűtöttük.
4. 800 µl fenol/kloroform hozzáadását követően kémcsőrázóval 1 percig erősen kevertettük, majd lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
5. A felső vizes fázist új Eppendorf csőbe átvittük, 1/10 térfogat 3 M Na-acetát pH 6.0 és azonos térfogatú izopropanol hozzáadása után 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk majd lecentrifugáltuk (13000 ford/perc, 10 perc).
6. A csapadék 500 µl TE pufferben való felvétele után 50 µl 3M Na-acetátot és 250 µl semleges fenol/kloroformot (savas fenol/kloroformot ekvilibrálni először 1/2 térfogat 1 M Tris-HCl pH 8.8-al, majd 1/2 térfogat 0,1 M Tris-HCl pH 8.0-al) hozzáadtunk, majd erősen kevertettük és lecentrifugáltuk (13000 ford/perc 5 perc).
7. A felső vizes fázist új Eppendorf csőbe átvittük, 500 µl izopropanollal kiegészítettük, kevertettük, majd lecentrifugáltuk (13000 ford/perc, 10 perc).
8. A csapadékot 5 ml TE pufferben újra feloldottuk, majd 250 µl 100 mM spermine-HCl hozzáadása és 1 perces kevertetés után 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, ezt követően pedig lecentrifugáltuk (13000 ford/perc 10 perc).
9. A csapadékhoz hozzámértünk 3 ml 0.3 M Na-acetát, 10 mM MgCl₂ oldatát, majd kevertetés után 7 ml etanollal kiegészítve újra rázattuk és szobahőmérsékleten 60 percig állni hagytuk és lecentrifugáltuk (13000 ford/perc).
10. Az izolált plazmidot 500 µl TE pufferben felvettük. Tárolás -20 °C-on.

3.3.4 Streptomyces törzsek transzformációja

A transzformációt az alábbi standard protokoll alapján végeztük:

Streptomyces lividans 1326 törzs transzformációja pIJ702 plazmival.

Protoplaszt előállítás

1. 25 ml YEME táptalajt 0,1 ml spóraszuszpenzióval inokuláltunk, majd sikrázógépen 30 °C-on, 40 óráig inkubáltuk.
2. A tenyészetet szobahőmérsékleten lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
3. A felülúszó leöntése után a sejteket mostuk 15 ml steril 10,3 %-os szaharóz oldattal, majd ismét lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 10 perc).
4. Az előző lépést megismételtük.
5. A felülúszó leöntése után a micéliumot 4 ml steril, 1 mg ml⁻¹ lizozimot tartalmazó P-pufferben felszuszpendáltuk és 30 °C-on 30-60 percig inkubáltuk.
6. Az esetleges micéliális göbök megszüntetése céljából steril pipetába néhányszor felszívtuk a szuszpenziót, majd 15 percig tovább inkubáltuk.
7. A szuszpenzió 5 ml P-pufferrel való kiegészítése után az előző lépést megismételtük. A protoplaszt képződését mikroszkóposan ellenőriztük.
8. A protoplasztot steril vattán keresztül az esetlegesen nem protoplasztálódott micéliális formák eltávolítása céljából szűrtük, majd ezt követően lecentrifugáltuk (3000 ford/perc, 7 perc).
9. Protoplasztokat 10 ml P-pufferben felszuszpendáltuk.
10. A protoplasztok hemocitómétreben való megszámlolása után mintegy 4×10^9 protoplasztot tartalmazó aliquot-ot használtunk egy transzformáláshoz.

Transzformálás

11. A protoplaszt lecentrifugálása (3000 ford/perc, 7 perc) és a felülúszó leöntése után a protoplasztot a visszamaradó utolsó csepp pufferben felszuszpendáltuk.
12. A plazmid DNS hozzáadása (maximum 20 mikroliter pufferben) után azonnal hozzáadtunk 0,5 ml 25 % PEG 1000 tartalmú P-puffert.
13. 2-3 perc állás után 5 ml P-pufferrel kiegészítettük és lecentrifugáltuk a protoplasztot (3000 ford/perc, 7 perc), majd újabb 1 ml P-pufferben felvettük.

R2YE lemezekre 0,1 ml szuszpenziót szélesztettünk és 30 °C-on 20-24 óráig inkubáltuk.

14. A transzformációs lemezeket 1,5 ml, a thiostreptont 0,66 mg ml⁻¹ koncentrációban tartalmazó deszt. vízzel felülrétegeztük. Két nap után a transzformánsok telepei már láthatóak.

3.3.5. RNS izolálás *Streptomyces*ekből

1. 50 ml TSBS folyékony táptalajon 37 °C-on 250 ford/perc frekvenciájú síkrázógépen egy éjszakán át növesztett kultúrát lecentrifugáltuk, mostuk, majd pedig 20 ml NMMP-ben szuszpendáltuk. Ebből 10 ml inokulumot adtunk 500 ml NMMP folyékony táptalajhoz. A tenyésztést szintén 37 °C-on és a fent említett frekvenciájú síkrázógépen végeztük, mialatt különböző időpontokban RNS izoláláshoz 50 ml mintát vettünk.
2. A mintát lecentrifugáltuk (10000 ford./perc, 8 perc), a micéliumot 3 ml lízis pufferben (a 3.2.3. pontban ismertetett P puffer a lizozimot 5 mg ml⁻¹ koncentrációban tartalmazza) felvettük és 37 °C-on 5 percig inkubáltuk.
3. 3 ml “2 x Kirby mix”-el (összetételét lásd a 3.3.2. pontban) kiegészítettük és 1 percig rázattuk.
4. 5 ml fenol:kloroform (1:1) hozzáadása után 2 percig kevertettük, majd 4 °C-on lecentrifugáltuk (10000 ford./perc, 10 perc).
5. A felső vizes fázist egy új csőbe vittük és a 4. lépést addig ismételtük, amíg a fázishatár tiszta nem lett.
6. A felső vizes fázishoz 0,1 térfogat 4 M Na-acetátot pH 6.0 és azonos térfogatú izopropanolt adtunk. 2 óra -20 °C-on történő inkubációt követően lecentrifugáltuk (9000 ford./perc, 15 perc).
7. A csapadékot 400 µl deszt. vízben oldottuk és a 6. lépés szerint a kicsapást megismételtük.
8. A csapadékot etanollal való mosás után 180 µl víz+20 µl 10 x DN-áz (0,5 M Tris-HCl pH 7.8, 50 mM MgCl₂) pufferben felvettük, majd 0,5 egység RN-áz mentes DN-ázt belemértünk és 37 °C-on 10 percig inkubáltuk.
9. Azonos térfogatú fenol:kloroformmal (1:1) extraháltuk, azonos térfogatú izopropanollal kicsaptuk, mostuk etanollal, majd a csapadékot 100 µl deszt. vízben feloldottuk.

3.3.6. S₁ nukleáz térképezés

1. 30 µg RNS-t és kb. 0,02 pmol radioaktív foszforral [(γ³²-P) dATP) 5'- terminálisan jelölt (T4 Polynukleotid kináz, Promega) DNS próbát tartalmazó mintát liofilizáltuk és a csapadékot 20 µl NaTCA pufferben (Murray, 1986) oldottuk fel.
2. 15 perc 70 °C-os vízfürdőben történő denaturálás után a vízfürdőt 45 °C-ra állítottuk. A hibridizációt egy éjszakán keresztül ezen a hőmérsékleten végeztük.
3. A következő nap 300 µl 75-100 egység S₁ nukleázt (Sigma III) tartalmazó 1 x S₁ nukleáz puffert hozzáadtunk (5 x S₁ nukleáz puffer: 4 M NaCl; 150 mM NaAc pH 4.4; 22,5 mM ZnAc; 100 µg ml⁻¹ részlegesen emésztett, denaturált nem homológ DNS) és 37 °C-os vízfürdőn 1 óráig inkubáltuk.
4. 40 µl 3 M NaAc pH 6.0 és 400 µl izopropanol hozzáadása után 1 órán keresztül jégen tartottuk, majd centrifugálás (10000 ford./perc, 10 perc) után a csapadékot 80 %-os etanollal mostuk.
5. 4-6 µl terminációs oldat (0,3 % Brómfenol kék; 0,3% Xylén cianol; 10 mM EDTA pH 7.5; 97,5% ionizálatlan formamid) hozzáadása után az elegyet 2 percig forraltuk (Strauch és mtsai.,1991).
6. A DNS-RNS hibridet 6 %-os szekvenáló gélen futtattuk meg.

3.3.7. Minigénbank készítése

A minigénbank készítése a *S. griseus* 45H törzsből a pBluescript II KS+ vektor (lásd 3.3.1 pont) felhasználásával történt.

1. Kromoszómális DNS-t a kiválasztott törzsből a 3.3.2. pontban leírtak szerint izoláltuk.
2. A genomiális DNS-t *SacII* enzimmel megemésztettük.
3. Az emésztett, 1 %-os agaróz gélen megfuttatott kromoszómális DNS-t Hybond-N membránra vittük át és a 39 bp-os digoxigeninnel jelölt próbával (a próba készítése az Eredmények fejezet 4.1. ill. 4.2. pontjában kerül ismertetésre) hibridizáltattuk.
4. A hibridizációs szignál alapján a kb. 2,8 kb. méretű fragmenteket tartalmazó agaróz géldarabot kivágtuk és a DNS-t visszaizoláltuk.
5. A DNS darabokat a szintén *SacII* enzimmel emésztett vektorba ligáltuk.
6. A ligált termékeket a 3.3.11. pontban említett módszer szerint az *E. coli* XL1 Blue gazdatörzsbe transzformáltuk.

7. A transzformánsokat ampicillint, IPTG-t és X-gal-t tartalmazó LB agarra szélesztettük ki.
8. Az ampicillin rezisztens fehér telepeket felszedtük, így 250 klónt tartalmazó génbankot kaptunk.

3.3.8. Telephibridizáció

A minigénbank DIG-jelzett oligonukleotiddal történő screenelésére és az N-terminálisan His-tag jelölt C-faktort tartalmazó transzformánsok szelektálására használtuk ezt a módszert. A receptet az utóbbi esetre vonatkoztatva ismertetem részletesen.

1. A transzformánsokat $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin és $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin tartalmú LB-agar lemezekre szélesztettük, majd 30°C -on egy éjszakán át inkubáltuk.
2. Miután a telepek átmérője elérte az 1-2 mm-t, HybondC- membránt helyeztünk a táptalajra. A membránt úgy, hogy a kolóniák a felszín felé legyenek $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin és 1 mM IPTG-t tartalmazó LB-agar táptalajra vittük át és 37°C -on 4 órán keresztül növesztettük tovább.
3. Ezt követően a filtereket a megadott sorrendben és ideig az alábbi oldatokkal átnedvesített Whatman 3MM szűrőpapírra helyeztük és szobahőmérsékleten inkubáltuk:

10 %-os SDS oldat	10	erc
denaturációs oldat (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl)	5	perc
neutralizációs oldat (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7.4)	5	perc
neutralizációs oldat	5	perc
2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M $\text{Na}_3\text{-citrát}$)	5	perc
4. A filtereket 2 x 10 percig TBS pufferben (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl) mostuk, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoló pufferben (3 % BSA TBS pufferben oldva) rázattuk.
5. A filtereket 2 x 10 percig TBS-Tween/Triton pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; 0,2 % Triton X-100) 10 percig TBS pufferben mostuk.
6. Az N-terminálisan His-tag jelölt C-faktor fehérje immunológiai kimutatására két különböző antitestet használtunk. Az első egérben termeltetett monoklonális antitestet -

Anti-polyHistidin Clon His-1 (Sigma A-4312)- blokkoló pufferben 1/2000 hígításban használtuk és ebben az oldatban a filtereket szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk, majd az 5. pont szerint mostuk.

7. A második, nyúlban termeltetett, Anti-Mouse IgG (Sigma H-1029), alkalikus foszfatázzal konjugált antitestet - Anti-Mouse IgG- blokkoló pufferben 1/10000-re hígítottuk. Az inkubációs és mosási lépések megegyeznek az első antitest esetén alkalmazottakkal.
8. A színreakció lejátszódása NBT (nitro blue tetrazolium klorid Sigma N5514 0,33 mg ml⁻¹) és BCIP (5-bromo-4 kloro-3-indolyl foszfát Sigma B0274 0,165 mg ml⁻¹) tartalmú előhívó pufferben (100 mM Tris-HCl pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) történt. A színreakciót deszt. vízzel való öblítéssel állítottuk le.

3.3.9. His-tag jelölt C faktor fehérje termeltetése *Streptomyces*ben és a fehérje minták előkészítése SDS-PAGE gélen való futtatáshoz

1. A *S. lividans* TK64/pSB9 és *S. griseus* 52-1/pSB9 transzformánsok (lásd az Eredmények fejezet 4.12. pontjában) HMM táptalajon 30 °C-on növesztett 72 órás tenyészetét lecentrifugáltuk (4000 ford./perc, 10 perc).
2. 10 ml felülúszóból a fehérjét 1,4 ml 50 %-os TCA-val csaptuk le, acetonnal mostuk, majd a következő összetételű 100 µl pufferben oldottuk fel: 15 % glicerin, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % SDS, 10 % Urea. A fehérjét a pufferrel hidegszobában 4 °C-on enyhén rázattuk. Az oldódás folyamata kb. 4 óra alatt ment végbe. A fehérje oldatot ezt követően 400 µl 5x SDS-PAGE minta pufferrel (15 % β-Merkaptoetanol, 15 % SDS, 1,5 % brómfenolkék, 50 % glicerin) egészítettük ki.
3. 10 ml tenyészetből lecentrifugált sejthez 1 ml B50 sejt puffert (100 ml-hez: 2,5 ml 1 M TRIS-HCL pH 7.5; 0,2 ml 0,5 M EDTA; 10 ml 87 %-os glicerin; 1 ml 0,5 M NaCl) adtunk, majd ultrahanggal történt feltárás után 200 µl sejtkivonatot 200 µl 2x Cracking pufferrel (100 ml-hez: 25 ml 0,5 M TRIS-HCL pH 6.8, 18 ml 87 %-os glicerin, 10 ml β-Mercaptoetanol, 4 g SDS, 0,2 % (w/v) brómfenolkék) egészítettük ki.
4. A fehérje mintákat 100 °C-on 10 percig történő denaturálás után 12 %-os SDS-PAGE gélen futtattuk meg.

3.3.10. His-tag jelölt C faktor fehérje termeltetése *E. coli*ban és tisztítása Ni-NTA oszlopon natív körülmények között.

1. 50 ml LB táptalajra (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin és 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamicin) a His-tag jelölt C faktor génjét tartalmazó pSB90 plazmiddal (a plazmid készítésének leírását lásd az Eredmények fejezet 4.13. pontjában) transzformált *E. coli* TOP 10 törzs 50 μl tenyészetét oltottuk le. A tenyészetet 37 °C-on egy éjszakán keresztül növesztettük.
2. Következő nap a fenti antibiotikumokat tartalmazó 4 x 100 ml LB táptalajhoz 5-5 ml adtunk az egy éjszakán keresztül növesztett tenyészetből és 37 °C-on növesztettük, míg sűrűsége elérte az OD₆₀₀ 0,5-0,7 közötti értéket. Ekkor 1 mM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk és további 4 órán keresztül tenyésztettük.
3. A lecentrifugált (4000 ford./perc, 20 perc) tenyészetet 8 ml lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) vettük fel, lizozimot adtunk hozzá (1 mg ml⁻¹) és 30 percig jégen tartottuk.
4. A sejtfal lizozimmal történő emésztése után a tenyészetet ultrahanggal feltártuk, majd 4 °C-on lecentrifugáltuk (10000 ford./perc, 30 perc). 8 ml tiszta lizátumhoz 2 ml 50 %-os Ni-NTA szuszpenziót mértünk hozzá és 1 órán keresztül 4 °C-on 200 ford./perc frekvencián enyhén rázattuk.
5. Az oszlopba töltött Ni-NTA-lizátum elegyet 2 x 8 ml mosó pufferrel (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) mostuk, ezt követően a Ni-NTA-hoz kötődött His-tag jelölt C faktort 4 x 1 ml elúciós pufferrel (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol) eluáltuk.
6. A mintákat 13 %-os SDS-PAGE gélen futtattuk meg.

3.3.11. C faktorról kölcsönható fehérje keresése

1. 400-400 ml HMM táptalajra külön-külön leoltott *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1, *S. griseus* 52-1/pSB90 törzset 30 °C-on 24, 48 ill. 72 óras korig tenyésztettük, majd lecentrifugáltuk (4000 ford./perc, 10 perc). A kísérlet további lépéseinek megtervezésénél a Song és munkatársai által 1996-ban közölt cikk módszertani útmutatásait is figyelembe vettük.
2. A lecentrifugált tenyészeteket deszt. vízzel mostuk, majd pedig mindegyikből 4 g-ot 6ml Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát puffer pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF) felszuszpendáltunk.
3. A French-press-el feltárt, kb. 10 ml térfogatú tenyészetekhez 100-100 µl 1 M-os MgCl₂-ot és egy spatulahegynyi DNáz-t adtunk. Ezt követően hidegszobában 1 órán keresztül enyhén kevertettük.
4. A tenyészeteket lecentrifugáltuk (4000 ford./perc, 10 perc), a felülúszót és a membrán frakciót elkülönítettük egymástól.
5. A felülúszókban Bradford-módszerrel (Bradford, 1976) meghatároztuk a fehérjekoncentrációt és mindegyik esetben 27 mg fehérjét tartalmazó térfogatú citoszollal dolgoztunk tovább. A *S. griseus* 45H, illetve a *S. griseus* 52-1 törzsek tenyészetéből nyert megfelelő térfogatú citoszoljához 500 µg ml⁻¹ koncentrációjú 200 µl His-tag jelölt C faktor fehérjét adtunk és 4 °C-on egy éjszakán keresztül együtt inkubáltuk. Párhuzamosan kontrollokat is készítettünk, melyek megfelelő térfogatú citoszoljához nem adtunk His-tag jelölt C faktor fehérjét.
6. Következő nap mindegyik mintához, a kontrollokhoz, illetve a *S. griseus* 52-1/pSB90 27 mg fehérjét tartalmazó citoszoljához 200 µl Ni-NTA-t adtunk és 4 °C-on 2 órán keresztül együtt inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk.
7. A Ni-NTA gyantát mindegyik esetben 4x2 ml mosó pufferrel (50 mM Na-foszfát pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM imidazol) mostuk. A C faktort és a vele feltehetően kölcsönható fehérjét a Ni-NTA gyantáról 2x200 µl elúciós pufferrel (50 mM Na-foszfát pH 8, 50 mM NaCl, 250 mM imidazol) eluáltuk.
8. 4-4 ml felülúszóhoz tartozó membrántörmelékét 500 µl 0,3 % TritonX-100-al kiegészített Na-foszfát pufferben felszuszpendáltuk, ultrahanggal még jobban feltártuk, majd lecentrifugáltuk (1000 ford./perc, 2 perc).

9. A továbbiakban a felülúszót használtuk és az 5. 6. 7. lépést ismételtük meg.

3.3.12. Antibiotikum koncentráció mérése agar diffúziós módszerrel

A baktériumok által termelt antibiotikumok koncentrációjának mérésére az agar diffúziós módszert alkalmaztuk.

1. 100 ml agaros titráló táptalajhoz 1 ml 10^{10} ml⁻¹ spóraszámú *B. subtilis* ATCC 6633 spóraszuszpenziót adtunk, jól összekevertük, hogy a megszilárdult táptalaj felszínén gepszerűen növekedjen, és egy 17,8 cm x 25,5 cm alapterületű üveg tepsibe öntöttük. Fontos, hogy az agar réteg vastagsága a tepsi egészében azonos legyen, mert a vastagság befolyásolhatja a kioltási gyűrű átmérőjét, amelyből az antibiotikum koncentrációjára következtethetünk. Az agar réteg ideális vastagsága 2-3 mm.
2. Egy kb. 4-6 mm átmérőjű élesre csiszolt peremű hengerrel agar korongokat távolítottunk el.
3. A streptomycinből 0,5 µg ml⁻¹, 1 µg ml⁻¹, 2 µg ml⁻¹, 3 µg ml⁻¹, 5 µg ml⁻¹ koncentrációjú oldatokat készítettünk. Az adott antibiotikumot ismeretlen koncentrációban termelő, pufferezett szűrt szójas táptalajon tenyésztett *Streptomyces* törzs fermentlevét a kísérletben töményen és 10 x hígításban használtuk.
4. Az eltávolított agar korongok helyén keletkezett lyukakba külön-külön 100 µl végtérfogatban felvittük az eltérő koncentrációjú standard oldatokat, illetve az ismeretlen antibiotikum tartalmú fermentlevet. Minden esetben 2 vagy 3 párhuzamos mintát vittünk fel.
5. Másnapra a *B. subtilis* összefüggő pázsitot alkot az agar felszínén, az antibiotikumot tartalmazó lyukak körül azonban kioltási gyűrű figyelhető meg. Az antibiotikumnak a környező agarba történő diffúziója kb. 6-8 óra elteltével leáll. Az a távolság, ameddig a baktériumok elpusztulásához szükséges antibiotikum koncentráció még eljut egy bizonyos idő alatt, arányos a felvitt antibiotikum koncentrációjával.
6. Az ismert koncentrációjú antibiotikum oldatokhoz tartozó kioltási gyűrűk átmérőjét egy tolómérő segítségével megmértük és a párhuzamos minták esetén kapott eredmények átlagát képeztük. Az ismert koncentrációk alapján fél logaritmus papíron ábrázoltuk a koncentrációkat (log. tengely) és a hozzájuk tartozó átmérőket.

3.3.13. Alapvető molekuláris biológiai módszerek

A kísérletek során az alábbi molekuláris biológiai módszereket használtuk még fel, melyek részletes ismertetésétől eltekintek. A receptek túlnyomó részét a Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch, Maniatis), Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 kézikönyvből* vettük, illetve a KIT-ek gyári leírásait követtük.

Plazmid izolálás <i>E. coli</i> ből	a. I/1.25-I/1.28* b. Sigma PLD-100 Gen Elute™ Plazmid Midi-Prep KIT
Agaróz gél elektroforézis	I/6.3-I/6.20*
DNS visszaizolálás agaróz gélből	Sigma 5-6501 Genelute Minus EtBr Spin Columns KIT
Ligálás	I/1.63-I/1.71*
<i>E. coli</i> transzformálás	I/1.82-I/1.84*
DNS fragmentumok amplifikálása polimeráz láncreakcióval	II/14.2*
Telehibridizáció	I/1.98-1.99*
Southern hibridizáció	a. Kapillártranszfer II/9.38* b. Vákum transzfer Hoefer TransVac™ TE80 készülékkel
SDS-Polyakrilamid gél elektroforézise és festése Coomassie brilliant blue-val	III/18.47-18.54* III/18.55*

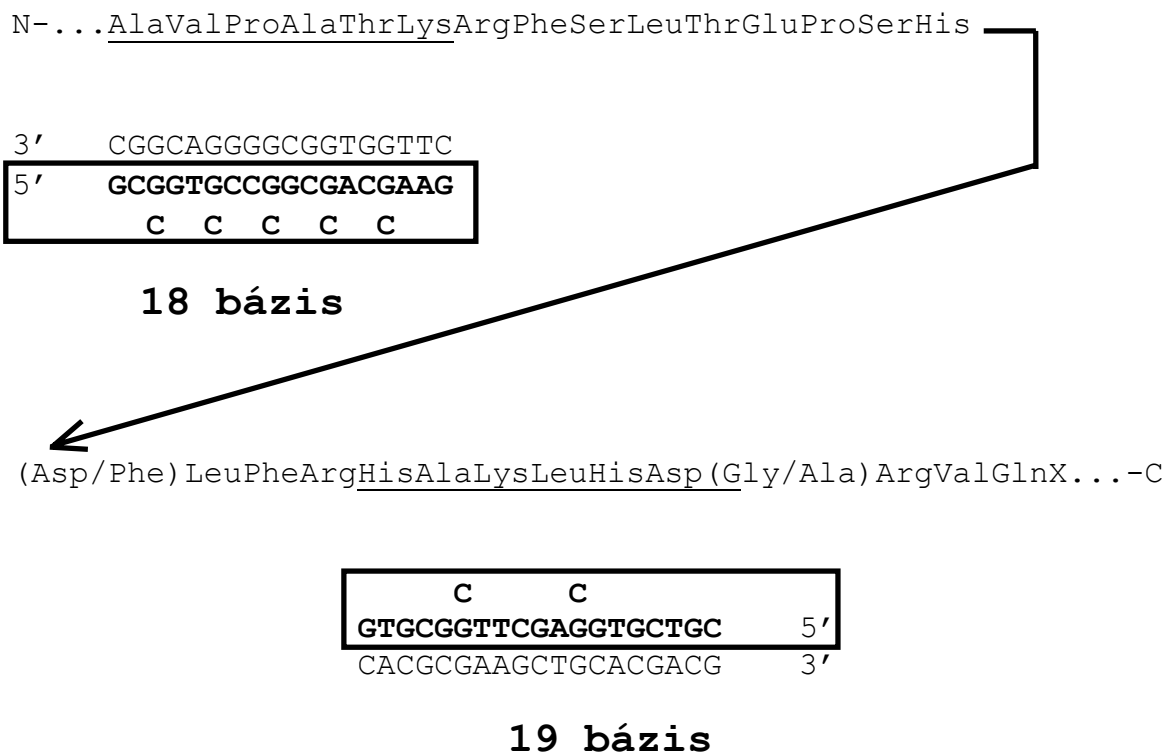
4. EREDMÉNYEK

4.1. A C faktor gén 5' - végének amplifikálása PCR reakcióban

A homogenitásig tisztított C faktor fehérje (Biró és mtsai., 1980) N-terminális végének szekvenálásával 29 aminosavat sikerült azonosítani: Ala-Val-Pro-Ala-Thr-Lys-Arg-Phe-Ser-Leu-Thr-Glu-Pro-Ser-His-(Asp/Phe)-Leu-Phe-Arg-His-Ala-Lys-Leu-His-Asp-(Gly/Ala)-Arg-Val-Gln. Az aláhúzott aminosav szekvenciák alapján egy 18 és egy 19 bázis hosszúságú degenerált oligonukleotidot terveztünk. A 26. pozícióban Gly vagy Ala valószínűsíthető, így ebben az esetben a kódoló bázishármasoknak csak az első azonos nukleotidját (G) használtuk fel a tervezés során.

Az oligonukleotidokat PCR reakcióban primerként használtuk fel. Az előremutató primer (18 bp) öt, míg a visszafelé mutató primer (19 bp) két helyen degenerált (1. ábra). A *Streptomyces*ek jellegzetes kodonhasználata alapján a bázishármasok 3. pozíciójában 92-96 %-os valószínűséggel G vagy C bázis található. Ez alapján abban az esetben, ha egy adott aminosavat kódoló bázishármasok 3. pozíciójában három vagy négy különböző nukleotid is lehetséges, a 3. pozícióban mindig G/C-t terveztünk. A PCR reakcióban a *SacI* enzimmel emésztett *S. griseus* 45H törzs kromoszómális DNS-ét használtuk templátként. A reakció lépései: 1 ciklus 94 °C (5 perc), 50 °C (2 perc), 72 °C (2 perc); 8 ciklus 94 °C (1 perc), 50 °C (2 perc), 72 °C (1 perc); 50 ciklus 92 °C (1 perc), 50 °C (1 perc), 72 °C (1 perc); 1 ciklus 94 °C (1 perc), 50 °C (2 perc), 72 °C (5 perc).

A PCR reakcióban az N-terminális szekvencia alapján, várakozásunknak megfelelően egy 76 bp hosszúságú DNS fragment szaporodott fel legnagyobb mennyiségben. Az így amplifikált, gélből visszaizolált PCR terméket a pUC19 plazmidba, a *SmaI* hasítóhelyre szubklónoztuk és megszekvenáltuk. A szekvencia azonosítása kézi szekvenálással történt a dideoxy lánc-terminációs módszer alapján (Sanger és mtsai., 1977). A 76 bp-os fragmentnek a két primer közé eső 39 bp hosszúságú része 100%-ban homológ a *S. griseus* 45H genommal.



1.ábra PCR próbák előállításának vázlata a C faktor N-terminális aminosav szekvenciájának alapján a génbank szűréséhez.

4.2. A C faktor gén klónozása, azonosítása

A C faktor gén detektálására nem egy hagyományos, a *S. griseus* 45H teljes genomját reprezentáló könyvtár, hanem egy kb. 250 klónból álló ún. minigénbankot hoztunk létre. A minigénbank készítésének módja az Anyag és Módszer fejezet 3.3.7. pontjában került ismertetésre. A génbank szűrésére a telephibridizáció során próbaként a 4.1. pontban említett 5'-végén digoxigeninnel jelölt (DIG Oligonucleotide 5'-End Labelling Set, Boehringer Mannheim) 39 bp hosszúságú oligonukleotidot alkalmaztuk.

A HybondN membránra átvitt, denaturált klónokat 2 óra 42 °C-on történő prehibridizáció után 42 °C-on egy éjszakán keresztül a 39 bp-os digoxigeninnel jelölt próbával hibridizáltattuk a Dig Nucleid Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) leírása alapján. Az alkalmazott mosási lépések: szobahőmérséklet, 15 perc; 42 °C, 30 perc; 55 °C, 30 perc: 2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS; 55 °C, 30 perc: 0,5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS.

A hibridizációt követő immunológiai detektálás során (Dig Nucleid Acid Detection Kit, Boehringer Mannheim) a kb. 250 klónból 2 telep adott pozitív jelet. A két telepet $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillint tartalmazó LB agarra átoltottuk és a telephibridizációt megismételtük. A kísérlet tesztelése során már csak az egyik esetben kaptunk pozitív szignált és a továbbiakban már csak ezzel a klónnal (pBZ3) dolgoztunk tovább.

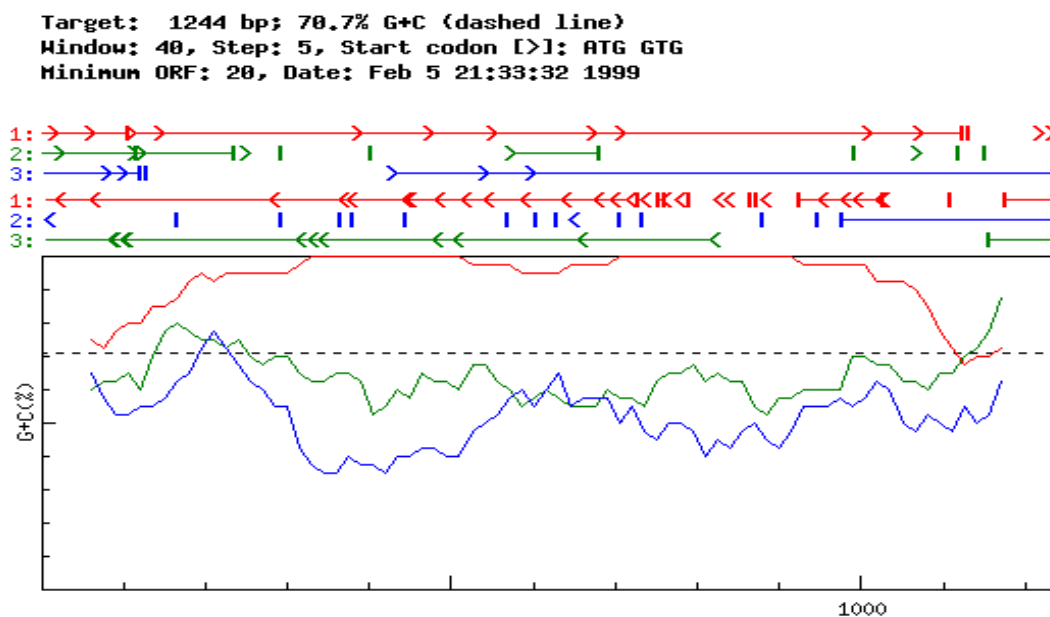
4.3. A pBZ3 klón szekvencia analízise

A szekvencia analízis során annak igazolására, hogy valóban a C faktor gént tartalmazó klónt emeltük ki, primerként először a fent említett 39 bp hosszúságú- a *S. griseus* 45H genommal 100 %-ban homológ- oligonukleotidot használtuk. Ezt követően a minigénbank készítésekor használt pBluescript II KS+ vektor poliklónozó helyét közrefogó T3 és T7 fág promóterével komplementer primereket külső primerekként alkalmaztuk, ill. a már ismert szekvencia alapján belső primert terveztünk és az inszert mindkét végéről elkezdtük a szekvenálást. A pBZ3 klón nukleotid sorrendjét egymást követő oligonukleotid primerek szintézisével (1. táblázat) ABI 373 automata szekvenátor (Applied Biosystems) felhasználásával határoztuk meg.

Az oligonukleotid sorszáma	Nukleotid szekvencia	Nukleotid pozíció
A szekvenálás során használt oligonukleotidok		
Előremutató primerek		
1.	5'-GGCCGACCTGTGCATCAC-3'	1283-1299
3.	5'-GCACCTCCTCGGCACTCG-3'	1485-1502
5.	5'-GAGCCCGAGGGCATGGGC-3'	1859-1876
7.	5'-AACGAGGCTCCCGGCGGG-3'	307-324
8.	5'-GCTGGGCGCGGGCTCGGC-3'	633-650
9.	5'-CGCACCCTTGTGCTCCC-3'	933-950
14.	5'-GGGAGGTCCGCCCCGGCG-3'	2029-2046
Reverz primerek		
2.	5'-GCCGGAACAGGTCGTGGG-3'	1178-1160
4.	5'-CCGAGCCGCAGCAGCCCG-3'	1059-1042
6.	5'-TCCTCCTGTGCGCCCCC-3'	736-719
10.	5'-GGCCACGAACAGCCGCG-3'	1252-1235
11.	5'-GATGGCGCAGGTCATCTC-3'	1549-1532
12.	5'-CAGCGTGGAACCGGCGCG-3'	1849-1832
13.	5'-ATCGGCTTCCTCATGCTG-3'	2128-2111

1. táblázat A C faktor gén szekvenálása során használt primerek.

A kódoló régiót PC/GENE program segítségével és FramePlot analízissel, a *Streptomyces*ek jellegzetes kodonhasználatára alapján azonosítottuk, amely azon alapszik, hogy a *Streptomyces* DNS magas G+C aránya (71-75 %) miatt a kodonok 3. pozíciójában 92-96 %-os valószínűséggel G vagy C bázis található (2. ábra). A DNS magas G+C aránya miatti szekvenálási hibák csökkentése érdekében mindkét szálát legalább egyszer leolvastuk. A pBZ3 klón a teljes gént (975 bp), s az expresszióját szabályozó régiót egyaránt tartalmazza.



2. ábra A C faktor gén FramePlot analízissel azonosított kódoló régiója, melynek a piros görbe által mutatott magas G+C tartalmú terület felel meg.

A C faktor gén kódoló régiója egy GTG start kodonnal (1007. nukleotid) kezdődik és egy TGA stop kodonig (1978. nukleotid) terjed (3. ábra); a kódolt fehérje 324 aminosavból áll és számított molekulatömege 34523 Da. A C faktor fehérje azonosítása és tisztítása a *S. griseus* 45H törzs pufferezett szűrt szójas táptalajon nőtt folyékony tenyészetének fermentlevegéből történt (Biró és mtsai., 1980). Ez alapján már a fehérje aminosav szekvenciájának ismerete nélkül tudható volt, hogy a C faktor fehérje kiválasztódik a sejtéből. A gén szekvenciájának ismeretében, a fehérje PC/GENE komputer programmal való analízise során azonosítottuk a szekréciós

szignálszekvenciát, melynek levágódása két különböző hasítóhely mentén történhet: Ser-Ala-Ala-Ala/Ala/Val-Pro-Ala (a lehetséges hasítóhelyeket a / jelek mutatják).

Mivel az érett fehérje ismert N-terminális szekvenciája Ala-Val-Pro-Ala aminosavakkal kezdődik, az Ala/Ala helyen történik a hasítás. A 38 aminosavból álló szekréción szignálszekvencia tipikus prokarióta szignálszekvencia; 3 fő részből áll: a pozitívan töltött N doménből, mely a szekréciónra kerülő fehérjét a sejtmembrán negatív töltésű foszfolipid rétegéhez horgonyozza ki, a citoplazma membránon való átjutás elkezdéséhez szükséges hidrofób H doménből és a C doménből (Pugsley, 1993; Nagarjan, 1993). A C faktor fehérje valószínűleg a nem olyan régen azonosított Sec-independens Twin-Arginin transzlokációs útvonalon választódik ki a sejtől. *E. coli*-ban számos periplazmatikus cofaktort kötő fehérje szignál peptidében megtalálható egy közös RR-motívum ([S/T]-R-R-X-[F/L]-L-K) közvetlenül a H domén előtt. A *S. griseus* 45H törzsben azonosított C faktor szignál peptidjében a következő RR-motívum található: S-R-R-G-L-L-R. A fehérje export pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, a Tat szekrécións útvonalnak *E. coli*-ban eddig 5 komponensét sikerült azonosítani: a TatA feltételezett membránhoz kötött fehérjét, az előzővel paralóg TatB fehérjét, a TatC feltételezett transzlokázt, a TatD citoplazmában oldott állapotban lévő proteint és a TatA-val paralóg TatE-t (Tjalsma és mtsai., 2000). Az ezen az útvonalon exportra kerülő fehérjék harmadlagos illetve negyedleges szerkezetük kialakulása után és ezt a szerkezetet megtartva választódnak ki a sejtől.

A sejtől kikerülő érett fehérje 286 aminosavból áll, a szekvencia alapján megállapítható molekulatömege 31038 Da, ami jól közelíti az SDS-PAGE gélen futtatott tisztított C faktor 34500 Da kísérletesen meghatározott molekulatömeget (Biró és mtsai., 1980), főleg ha figyelembe vesszük, hogy a C faktor egy igen bázikus fehérje. Izoelektromos pontja 9.59, ami jó egyezést mutat a korábban mért 9.9 értékkel (Szeszák és mtsai., 1991).

Az aminosav szekvenciát különböző komputer programokkal - pl. Tmpred (Hofman és Stoffel, 1993), DAS (Cserzo és mtsai., 1997) - analizálva arra a következtetésre jutottunk, hogy az érett fehérje valószínűleg rendelkezik egy transzmembrán régióval, mely domén a 69. és a 90. aminosav közötti szakaszon található.

857 CCACCGCCGCGCCGCACTCCGGTGCCCGGTGGCGGACCCTGGACAAGCCCCGTCCGCACG

917 GCAACGATGCCGATATCGCACCACTTGTGCTCCCACCATCGGAAGTGAGACAACGTGAGT

977 GACCTCCGTGACGTACCGGAGCGGGACGGCGTGCCGGCGGGCTACGACCTCGTCGCCGAGC
ValProAlaAlaThrThrSerSerProSer

Twin-Arginin motívum **szekréciós szignál szekvencia**

1037 CGGCGCGGGCTGCTGCGGCTCGGCGGGCGGGCTCGTCGCCGCTCCGCCTTCGGCCTGAGC
ArgArgGlyLeuLeuArgLeuGlyGlyGlyLeuValAlaAlaSerAlaPheGlyLeuSer

1097 TTCGGCGCGGGCAGTGC GGCGGGCGGCCGTACCGGCCACCAAGCGGTT CAGCCTGACCGAG
PheGlyAlaGlySerAlaAlaAlaAlaValProAlaThrLysArgPheSerLeuThrGlu

1157 CCGTCCCACGACCTGTTCCGGCACGCGAAGCTGCACGACGCGCGGGTCCAGCAGTCGTTT
ProSerHisAspLeuPheArgHisAlaLysLeuHisAspAlaArgValGlnGlnSerPhe

1217 ACCTTCGACATCGTCAACCGGCGGCTGTTCTGTTGGCCAGTTGAAGTCGGGCTCGCCCGAC
ThrPheAspIleValAsnArgArgLeuPheValAlaGlnLeuLysSerGlySerProAsp

1277 GACAGCGGCGACCTGTGCATCACCCAGCTGGACTTCTCGGGCAACAAGCTGGGCCACATG
AspSerGlyAspLeuCysIleThrGlnLeuAspPheSerGlyAsnLysLeuGlyHisMET

1337 TACCTGCTCGGCTTCGGCCACGGCGTCTCCATCGGCGCCAGCCGGTTCGGCGCGGACACG
TyrLeuLeuGlyPheGlyHisGlyValSerIleGlyAlaGlnProValGlyAlaAspThr

1397 TACCTGTGGACGGAGGTGGACGTCAACAGCAACGCGCGTGGCACCCGGCTGGCCCCGGTTC
TyrLeuTrpThrGluValAspValAsnSerAsnAlaArgGlyThrArgLeuAlaArgPhe

1457 AAGTGGAAACAACGGCGCGACGCTCAGCCGCACCTCCTCGGCACTCGCCAAGCACCAGCCG
LysTrpAsnAsnGlyAlaThrLeuSerArgThrSerSerAlaLeuAlaLysHisGlnPro

1517 GTCCCCGGCGCCACCGAGATGACCTGCGCCATCGACCCGGTCAACAACCGCATGGCGATC
ValProGlyAlaThrGluMETThrCysAlaIleAspProValAsnAsnArgMETAlaIle

1577 CGTACCTACCGCCTCGGGCCGCGCTACGGCATCTACAACGTCGCCGACATCGCCGCC
ArgTyrLeuThrAlaSerGlyArgArgTyrGlyIleTyrAsnValAlaAspIleAlaAla

1637 GGCGTCTACGACAAGCCGCTCTCCGACGTCCCGCACCCACGGGCTGGGCACCTTCCAG
GlyValTyrAspLysProLeuSerAspValProHisProThrGlyLeuGlyThrPheGln

1697 GGGTACGCGCTGTACGGCAGCTACGTCTACCAGCTCACCGGCAACCCGTACGGCCCCGGAC
GlyTyrAlaLeuTyrGlySerTyrValTyrGlnLeuThrGlyAsnProTyrGlyProAsp

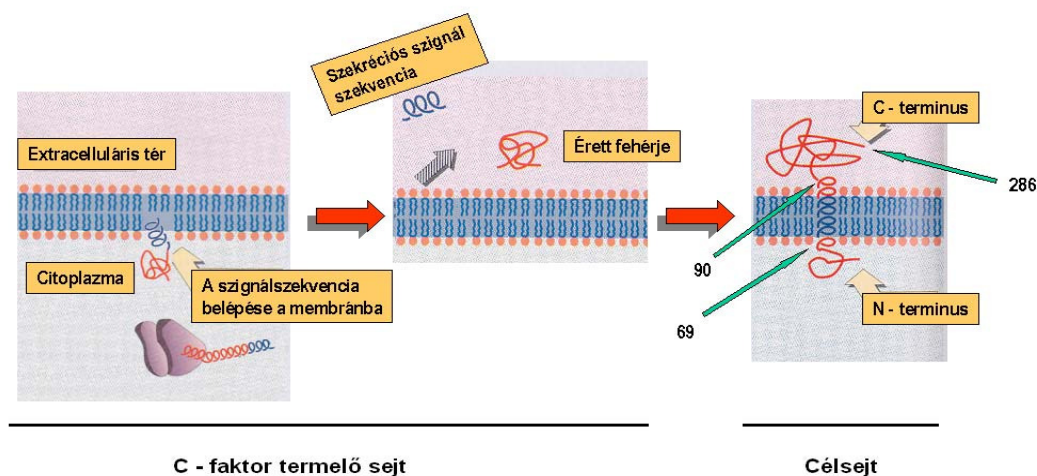
1757 AACCCGAACCCGGGCAACTCCTACGTCTCCAGCGTCGACGTCAACACCGGCGCCCTGGTTC
AsnProAsnProGlyAsnSerTyrValSerSerValAspValAsnThrGlyAlaLeuVal

1817 CAGCGGGCCTTACCCGCGCCGGTTCCACGCTGACCTTCCGCGAGCCCGAGGGCATGGGC
GlnArgAlaPheThrArgAlaGlySerThrLeuThrPheArgGluProGluGlyMETGly

1877 ATCTACCGGACGGCCGCGGAGGTCCGCTTCTCCTGGGCTTCGCCTCGGGTGTGGCA
IleTyrArgThrAlaAlaGlyGluValArgLeuPheLeuGlyPheAlaSerGlyValAla

1937 GGGGACCGCCGCGCAATCTGTTCTACAAGAACGTCTGATCTGA
GlyAspArgArgSerAsnLeuPheTyrLysAsnValLeuIle---

A fermentlébe kiválasztódó fehérje feltehetőleg a differenciálódás korábbi stádiumában lévő sejtek membránjába épül be úgy, hogy N-terminális vége a sejt belső tere felé, míg C-terminális vége az extracelluláris tér felé mutat (4. ábra). Ezt a feltételezést alátámasztja az a kísérleti eredmény, hogy a *S. griseus* 52-1 törzs folyékony szűrt szójas táptalajon növesztett kultúrájához adott C faktor rövid időn belül eltűnik a tenyészetből.



4. ábra Modell. A C faktor szekréciónja a Twin-Arginin transzlokációs útvonalon, illetve a fermentlébe kiválasztódó fehérje integrációnja a differenciálódás korai stádiumában lévő sejtek membránjába a feltételezett transzmembrán régióján keresztül úgy, hogy az N-terminálisa a sejt belső tere felé, míg C-terminálisa az extracelluláris tér felé mutat.

← 3. ábra A megszekvenált 2194 bp pBZ3 klón 857-1981 bp közé eső szakasza. Az egyszeresen aláhúzott nukleotid szekvenciák közül az RBS feliratú a riboszóma kötőhelyet jelöli, ezt követően pedig a szekréción szignál szekvencia van azonos módon kiemelve. A szekréción szignálon belüli Twin-Arginin motívum aminosav sorrendjét egyszeres aláhúzás jelöli. A szimplán, duplán, szaggatottan és vastagon aláhúzott, felirattal nem jelzett aminosav szekvenciák a HPLC/ESI-MS/MS módszerrel azonosított triptikus fragmentek szekvenciái.

A 29 N-terminális aminosav szekvenciáját adatbankokban hozzáférhető ismert szekvenciákkal összehasonlítva számos cink-ujj típusú szabályozó fehérjével mutatott szignifikáns homológiát (5. ábra). Már előtte ismert volt, hogy a C faktor fehérje képes egy- és két-szálú DNS-hez kötődni (Bíró és mtsai., nem publikált eredmények); továbbá a cink fokozta a C faktor biológiai hatását. Ez a megfigyelés később megerősítést nyert, mikor a C faktor fehérjét sikerült cink-affinitás oszlopon tisztítani (Szeszák és mtsai., 1997). Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy egy cink-ujj típusú szabályozó fehérjéről van szó.

C faktor:	17							24		
	Leu-Phe-Arg-His-Ala-Lys-Leu-His									
Cink-ujj fehérjék:										
<i>C. elegans</i>	62	Leu	Ser	Arg	His	Ala	Arg	Leu	His	69
(6/8, 1+)	376									383
<i>X. laevis</i> oocyte		Leu	Leu	Glu	His	Arg	Lys	Ile	His	
(4/8, 1+)	133									140
<i>X. laevis</i> gastrula		Leu	Ala	Arg	His	Leu	Arg	Ile	His	
(4/8, 3+)	558									565
Human NIL-2A		Leu	Ile	Glu	His	Met	Arg	Leu	His	
(4/8, 1+)	947									954
Human AREB6		Leu	Ile	Glu	His	Met	Arg	Leu	His	
(4/8, 1+)										

5. ábra Cink-ujj típusú fehérjéknek a C faktor N-terminális aminosav szekvenciájával homológ szakaszai

A DNS szekvencia alapján megállapított aminosav sorrend nem igazolta azon várakozásunkat, hogy a C faktor egy DNS-hez kötődő cink-ujj típusú fehérje, így felmerült annak a lehetősége, hogy translációs frameshifttel egy más aminosav sorrendű fehérje keletkezik erről a DNS szakasról. Az eredetivel közel azonos méretű leolvasási keretet kapunk ha az eredeti szekvenciába az 1211. pozícióban beillesztünk egy nukleotidot. A kódolt fehérje aminosav sorrendjében ebben az esetben 20 His

található, melyek közül a legtöbb viszonylag szabályosan, egymástól 5-6 aminosav távolságra van. A Frame Plot analízis alapján azonban ez nem egy tipikus, a *Streptomyces*ekre jellemző kódoló szekvencia. A DNS magas G+C aránya megnehezítette a szekvenálást és ezáltal növelte a hibák előfordulásának esélyét, ezért úgy gondoltuk, hogy a kérdés megnyugtató megválaszolásához szükséges a fehérje aminosav sorrendjének HPLC/ESI-MS/MS technikával történő meghatározása.

4.4. A C faktor fehérje molekulatömegének és aminosav sorrendjének meghatározása HPLC/ESI-MS/MS módszerrel

A *S. griseus* 45H törzs csak kis mennyiségben termeli a C faktort, 10 liter folyékony kultúra fermentlevéből néhány száz mikrogrammnyi fehérje tisztítható, ezért a molekulatömeg és a triptikus fragmentek szekvenciájának a meghatározásához egy olyan módszerre volt szükség, mely igen kis mennyiségű biológiai minta esetén is megbízhatóan működik. A választott kapilláris kromatográfia/microelectrospray tömeg spektrometriával történő meghatározásához 13 µg fehérjére volt szükség. A méréseket a szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosi Kémiai Intézetében T. Szabó Pál és munkatársai végezték, ezért az eljárás ismertetésétől az Anyag és módszer fejezetben eltekintettem.

A C faktor fehérje mért molekulatömege: 31047 ± 9 Da jó egyezést mutat a szekvencia alapján számított 31038 értékkel. A triptikus emésztést követően a legnagyobb intenzitású csúcsokat adó peptid fragmentek szekvencia analízise HPLC/ESI-MS/MS méréssel történt. A fehérje teljes aminosavsorrendje ezzel a módszerrel nem került meghatározásra, azonban az azonosított peptid szakaszok jól lefedik a C faktor minden egyes régióját.

Az adatok ismeretében megállapítottuk, hogy a Frame Plot analízissel azonosított nyitott leolvasási keret alapján kapott aminosavszekvencia megfelelő szakaszaival a triptikus fragmentek 100 %-ban megegyeznek (3. ábra).

4.5. A C faktorraal homológ fehérje keresése

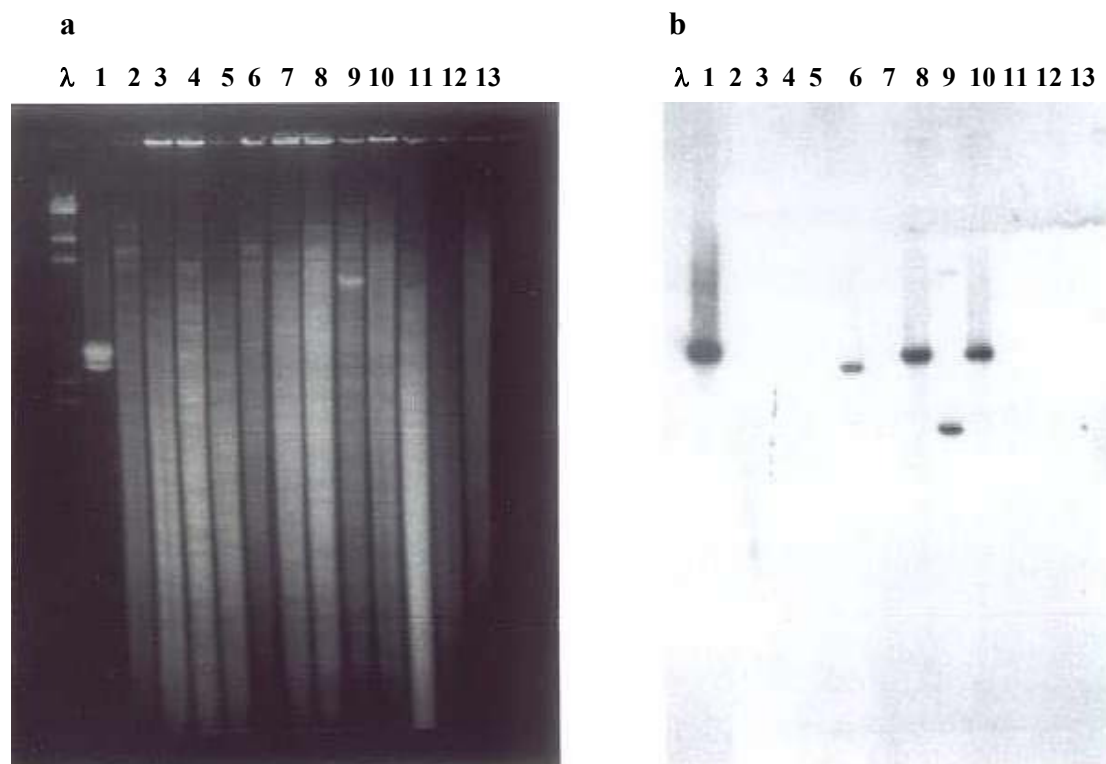
Az érett fehérje aminosavsorrendjét összehasonlítottuk adatbankok szekvenciáival a Blast Search (Altschul és mtsai., 1997) program segítségével. Az analízist kiértékelve a C faktor teljes aminosav szekvenciáját lefedő alacsony fokú homológiát találtunk a *B. subtilis* 168 törzs által termelt, TagC fehérjével (29 % aminosav azonosság 6 megszakítással). A kezdeti eredmények alapján úgy gondolták, hogy a TagC a Gram pozitív baktériumok sejtfalát alkotó teichoinsav bioszintézisében játszik szerepet és génjének expressziója sporulációs-specifikus (Mauël és mtsai., 1991; 1994). A TagC fehérje génjéről azonban kiderült, hogy bár a teichoinsav bioszintézis operonját tartalmazó kromoszóma szakaszon van, mégsem az operon része. A TagC azonos a DinC fehérjével (Cheo és mtsai., 1991, 1993), mely az SOS regulonhoz tartozik. A *dinC* átíródását a DNS kötő DinR fehérje szabályozza. Gram pozitív baktériumokban a promóter régióban található DinR box konszenzus szekvenciája: 5'-CGAACRNRYGTTYC-3'. Ehhez hasonló szekvencia azonban a C faktor gén promóter régiójában nem található meg, ami kétséges teszi, hogy bármilyen összefüggés is lenne a két fehérje közt.

4.6. A C faktor gén azonosítása különböző *Streptomyces* törzsekben

A C faktor vagy azzal homológ gén jelenlétét a *S. griseus* 45H törzsön kívül, melynek fermentlevéből a fehérje tisztítása történt, 11 különböző *Streptomyces* törzsben Southern hibridizációval teszteltük. Próbaként a gén 860 bp hosszúságú (930-1790 nt), radioaktív foszforral [$(\alpha^{32}\text{-P})$ dCTP] jelölt (MegaprimeTM DNS jelölő KIT, Amersham) *EcoRV-SalI* fragmentjét használtuk, mely a kódoló régió 80 %-át lefedi. A törzsek *SacII* enzimmel emésztett Hybond N membránra átvitt kromoszómális DNS-eit, a próbával 42 °C-on egy éjszakán keresztül hibridizáltattuk. Az alkalmazott legerősebb mosási lépéssel (0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS; 65 °C; 30 perc) a C faktorra kb. 87%-os vagy annál nagyobb homológiát mutató DNS fragmentek detektálhatóak.

Várakozásunknak megfelelően a *S. griseus* 45H törzs erős hibridizációs jelet adott, hasonló intenzitású szignálokat kaptunk a *S. albus* 391, *S. flavofungini*, *S. albus* R-55 kromoszómális DNS-ével. A többi esetben, ide értve a C faktorra érzékeny *S. griseus* 52-1 teszt törzsünket is, értékelhető szignál nem volt megfigyelhető (6. ábra).

A C faktorral legalább 87 %-ban homológ gént hordozó fent említett három *Streptomyces* törzs és a *S. griseus* 45H a többi tesztelt törzssel ellentétben folyékony tápközegben is spórázik (Vítális és mtsai., 1981). Feltételezhető, hogy a C faktornak folyékony kultúrában szerepe van a spóráképzés iniciálásában.

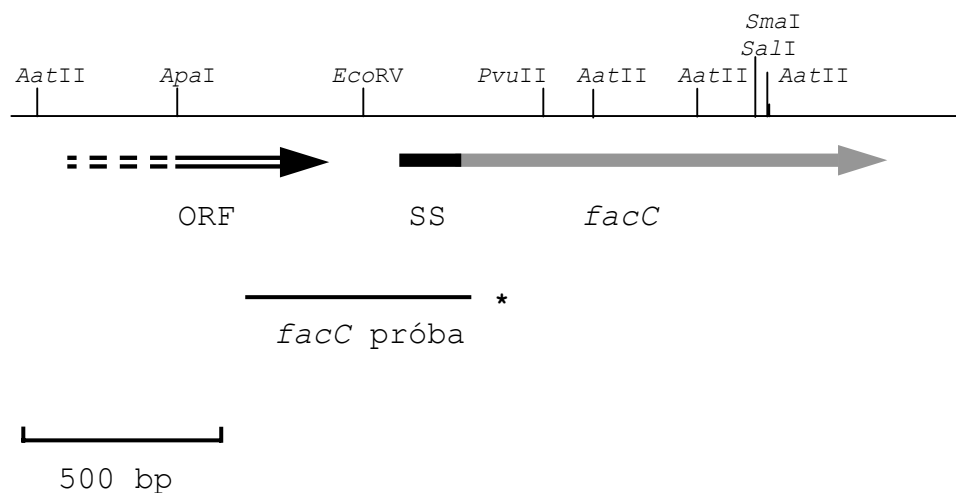


6. ábra C faktor gén azonosítása különböző *Streptomyces* törzsekben. (a) Ethidiumbromiddal festett 1 %-os agaróz gél. (b) Southern hibridizációs mintázat, autoradiogram. λ, *Hind*III enzimmel emésztett λ fág DNS. A *Streptomyces* törzsek kromoszómális DNS-ének emésztése *Sac*II enzimmel történt. 1. pBZ3 plazmid DNS, 2. *S. clavuligerus*, 3. *S. parvulus*, 4. *S. griseoviridans*, 5. *S. coelicolor* M145, 6. *S. albus* 391, 7. *S. griseobrunneus*, 8. *S. flavofungini*, 9. *S. albus* R-55, 10. *S. griseus* 45H, 11. *S. griseus* 52-1, 12. *S. lividans* 1326, 13. *S. fradiae*.

4.7. Transzkripció start pont azonosítása S1 nukleáz térképezéssel

A C faktor transzkripció analízise keretében S1 nukleáz térképezéssel meghatároztuk a transzkripció start pontot. A technika részletes leírása az Anyag és Módszer fejezet 3.3.6 pontjában található.

Próbaként a gén pSGF7 templátról PCR reakcióban az M13 univerzális és a ^{32}P -vel végjelölt 2. reverz primerrel (nukleotid pozíció: 1178-1160, a primer szekvenciája az 1. táblázatban található) felszaporított 547 nt hosszúságú szakaszát használtuk, ahol a promóter régiót és a transzkripció start pontot sejtettük (7. ábra, 8. ábra). A pSGF7 a teljes gént hordozó pBZ3 rekombináns plazmidról az előbb is említett, a szekvenálás során is használt 2. reverz és a 8. előremutató (nukleotid pozíció: 633-650, lásd 1. táblázat) primerekkel amplifikált 547 bp fragmentet a pUC18 plazmid *Sma*I hasítóhelyén tartalmazó konstrukció. A PCR reakció lépései: 30 ciklus 60 sec 94 °C, 60 sec 54 °C, 60 sec 72 °C. A próba 3' - végén lévő, a C faktor génnel nem homológ 50 nt hosszúságú túlnyúló rész lehetővé teszi az eredmény kiértékelésekor a DNS-RNS hibrid, illetve az RNS-el nem hibridizált DNS próba közötti különbség tételét.

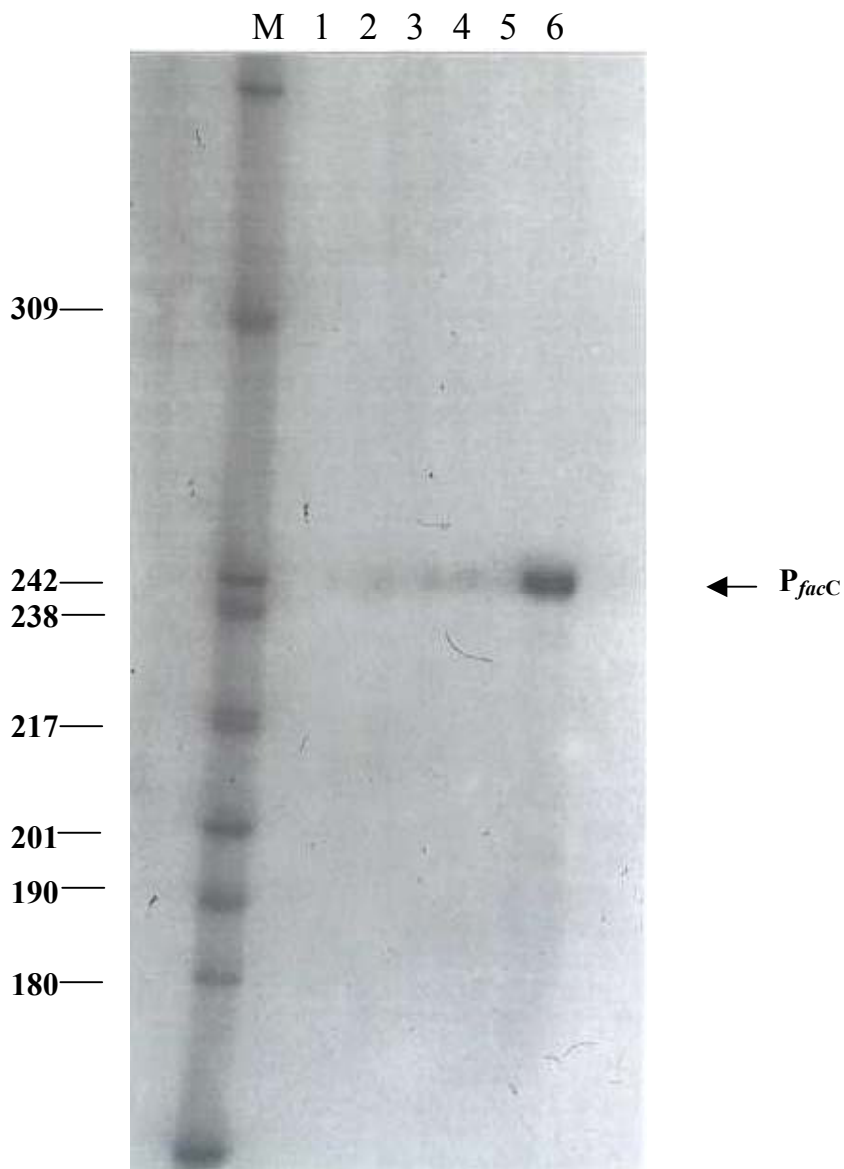


7. ábra A C faktor gén és a környező szekvenciák restriktions térképe, az S1 nukleáz térképezés vázlata. A nyílak a nyitott leolvasási kereteket mutatják. A csillag az S1 nukleáz térképezés során használt próba P^{32} -vel jelölt 5' - végét reprezentálja. Az SS felirattal jelzett szakasz a C faktor szekréciós szignálszekvenciájának felel meg.

spórákat képez. Ilyen körülmények között tehát az élelciklus lerövidül és a gén expressziójának időbeli változása jól nyomon követhető. A különböző időpontokban vett *S. griseus* 45H tenyészetből izolált RNS-t és a radioaktív foszforral jelölt, fent ismertetett DNS próbát hibridizáltattuk, S1 nukleázzal kezeltük. A képződött DNS-RNS hibrid mintákat 6 %-os poliakrilamid gélen futtattuk meg, standardként a *HpaII* enzimmel emésztett és denaturált pBR322 plazmidot használtunk.

Az első gyenge 244-245 nt hosszúságú szignálokat, melyek a transzlációs start előtti, a transzkripciós start pontoknak megfelelő 74.(A), illetve 75.(T) nukleotidot jelölik, az átoltást követően 1 órával detektáltuk. Olyan méretű transzkriptumot, mely arra engedne következtetni, hogy a C faktor gén átíródása az előtte lévő- általunk részlegesen megszekvenált, de nem ismert funkciójú- ORF által kódolt génnel kapcsolatosan történik, nem azonosítottunk. A legerősebb jelet az átoltás után 4 órával, a sporuláció kezdeti stádiumában lévő tenyészetből izolált mRNS minta esetén kaptuk (9. ábra). Megállapítottuk, hogy a C faktor gén 2 transzkripciós start ponttal rendelkezik, melyekről alternálva indulhat a transzkripció. A gén kifejeződése függ a növekedési fázistól, mert a kapott szignál erőssége fokozódott a tenyésztési idő előrehaladtával. Ez megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a C faktornak a sporuláció bekapcsolásában is szerepe lehet.

A transzkripciós start pontok alapján feltételezhető -35-ös régió: TGGACA illetve a -10-es régió: AACGAT 17 nt távolságra van egymástól (8. ábra). A transzkripciós start pont(ok) tipikusan és a mi esetünkben is 6-7 nt távolságra van(nak) a -10-es promóter régiótól (Hawley és McClure, 1983). A promóter régiót a konszenzus szekvenciákkal való homológia alapján valószínűleg a σ^{70} család első csoportjába tartozó σ^{hrdB} faktor ismeri fel. A -35-ös promóter régió szekvenciája nagyfokú homológiát mutat a σ^{hrdB} által felismert konszenzus *Streptomyces* promóter szekvenciákkal (TTGACA; Hawley és McClure, 1983), míg a -10-es promóter régió esetében a homológia foka alacsony (TATAAT Hawley és McClure, 1983).



9. ábra A C faktor gén transzkripciója komplett TSBS táptalajról minimál MM táptalajra való áttöltést követően. M, ^{32}P -vel végjelölt *HpaII*-enzimmel emésztett pBR322 molekulásúly standard. P_{facC} , C faktor gén transzkriptuma. Az áttöltést követően 0, 30, 60, 120, 240 és 420 perc múlva vett tenyészetekből izolált mRNS-t az 547 nt hosszúságú ^{32}P -vel végjelölt DNS próbával hibridizáltattuk. Az S1 nukleáz rezisztens DNS-mRNS hibrideket a mintavétel időbeli sorrendjének megfelelően az 1-6-os pályán futtattuk meg.

4.8. A C faktor promóterének *in vivo* promóter próba analízise *S. coelicolor*ban

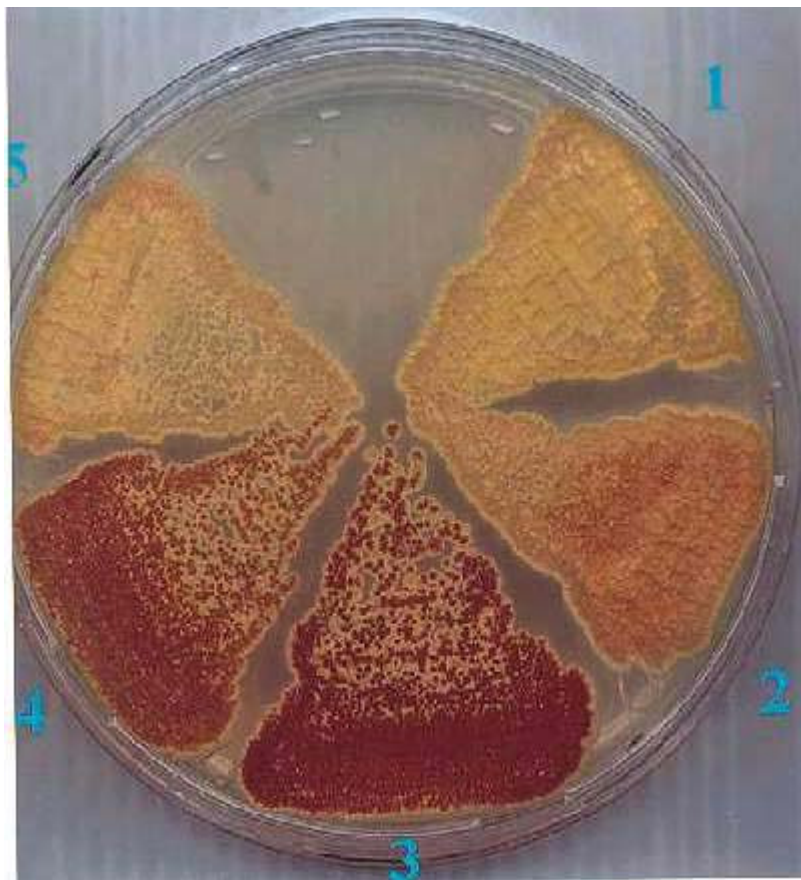
A promóter aktivitás méréséhez a promóter nélküli *redD* gént hordozó pIJ2587 *E. coli*-*Streptomyces* ingázó promóter próba vektort (jellemzését lásd az Anyagok és módszerek 3.3.1. pontjában) használtuk. A *redD* gén által kódolt protein a vörös színű undecilprodigiosin (Red) antibiotikum szintézisét aktiváló regulációs kaszkád utolsó tagja (Narva és Feitelson, 1990).

A C faktor gén - az S1 nukleáz térképezés eredménye alapján feltételezhetően - promóter régióját tartalmazó 547 bp hosszúságú szakaszát PCR reakcióban a szekvenálás során is használt 2. ill. 8. primer párral felszaporítottuk és a promóter nélküli *redD* gén elé ligáltuk. A *redD* kazettát két terminátor fogja közre, a methylenomycin rezisztencia gén és egy fág terminátora, melyek biztosítják, hogy a *redD* transzkripciója csak az elé klónozott C faktor promóterről történhessen. Mivel a *redD* gén a regulációs kaszkád utolsó tagja, az antibiotikum szintézis mértéke utal a *redD* sejten belüli koncentrációjára. A vörös színű pigment a hifafonalakban marad, mely megkönnyíti a vörös pigmentet termelő és nem termelő kolóniák azonosítását (van Wezel, 2000).

A C faktor promóter régióját tartalmazó pIJ2587-*facCp* rekombináns plazmidot *S. coelicolor* M512 (M145 $\Delta redD$, $\Delta actII$ -ORF4) törzsbe transzformáltuk, a transzformánsokat R5 szilárd táptalajra szélesztettük és a vörös pigment színintenzitása és felhalmozódásának helye alapján a C faktor promóter aktivitását, illetve azt vizsgáltuk, hogy a C faktor az élelciklus mely szakaszában játszik szerepet.

A szélesztést követő 4.-5. napon, a légmicéliumképzés megindulása után 12 órával rózsaszín légmicélium jelent meg (10. ábra). A gyengébb színintenzitás arra utal, hogy a gén alacsony szinten kerül átírásra. Mivel az expresszió nem olyan intenzív, nem lehetünk biztosak abban, hogy a szubstrátmicéliumban nem történt kisebb mértékű felhalmozódás. A kontroll kísérletben - a *S. coelicolor* M512 törzset C faktor promóter nélküli pIJ2587 vektorral transzformálva - a transzformánsok telepei fehérek maradtak, ami arra utal, hogy a *redD* gén ebben az esetben nem íródott át.

A kísérlet eredménye igazolta, hogy a C faktor promóter régiója valóban közvetlenül a gén előtt helyezkedik el; továbbá a promóter differenciálódás függően a légmicélium képzéssel kapcsolatosan aktiválódik.



10. ábra A C faktor promóterének *in vivo* promóter aktivitás mérése *S. coelicolor* M512 (M145 $\Delta redD$, $\Delta actII$ -ORF4) törzsben. 1. pIJ702 kontrol plazmiddal transzformált *S. coelicolor*. 2. pIJ2587-*facCp* rekombináns plazmidot hordozó *S. coelicolor* (expresszió C faktor promóterről). 3-4. pIJ2587-*ramCp*. rekombináns plazmidot hordozó *S. coelicolor* (expresszió *ramC* vegetatív promóterről) 5. Promóter nélküli C faktor gént tartalmazó pIJ2587 plazmiddal transzformált *S. coelicolor* R5 szilárd táptalajon növesztett 5 napos tenyészet.

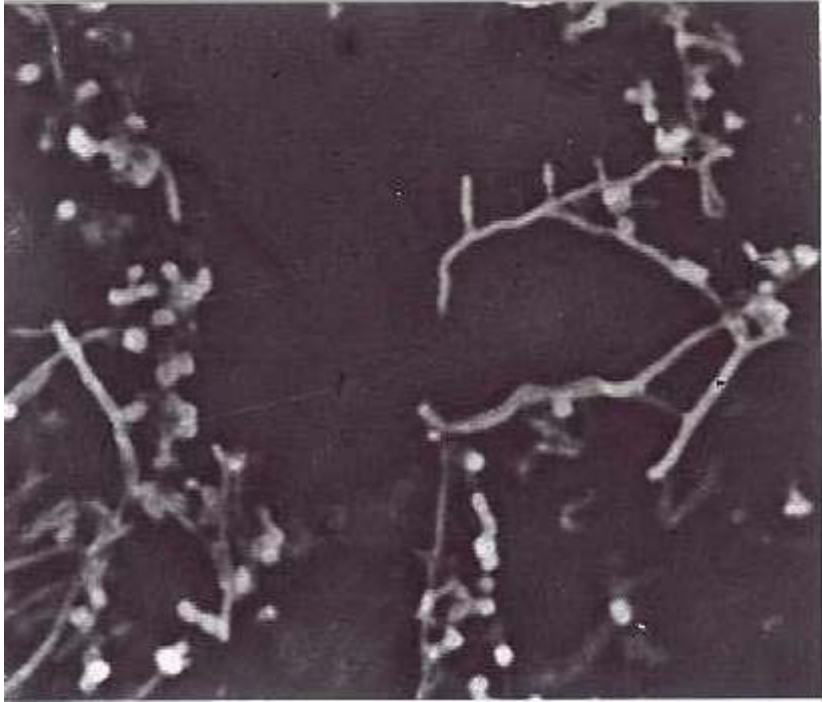
4.9. A C faktor expressziójának hatása *S. griseus* 52-1 törzsre

A következő kísérletsorozatban a C faktor gén expressziójának a differenciálódásra kifejtett hatását vizsgáltuk. A C faktor gént és az előtte lévő regulációs szignálokat is tartalmazó 2,1 kb nagyságú *KpnI* és *XbaI* enzimmel emésztett fragmentet szubklónoztuk egy alacsony (pHJL401) és egy magas (pWHM3) kópiaszámú *E. coli*-*Streptomyces* ingázó vektorba, melyek emésztése szintén *KpnI*-*XbaI* enzimpárossal történt. A

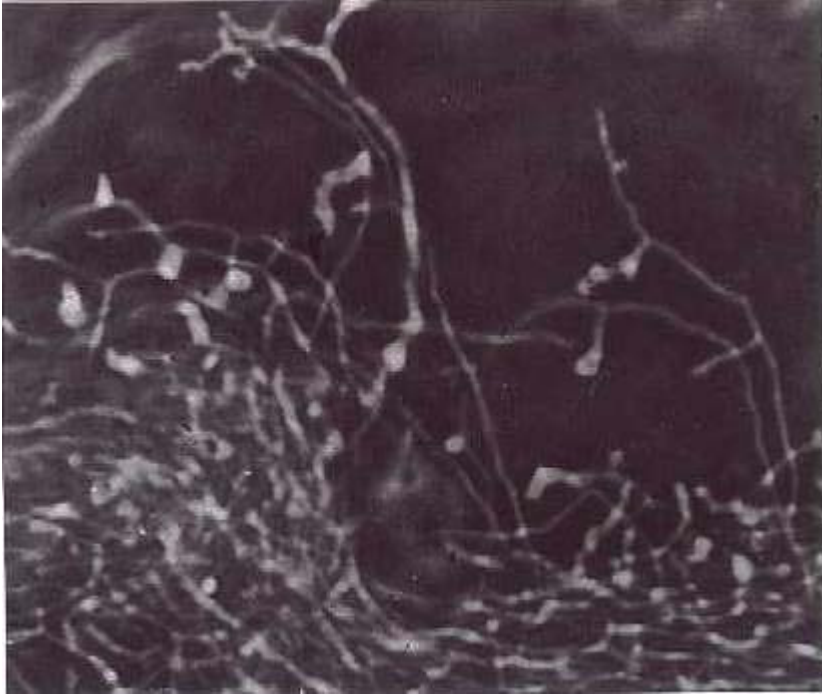
pHJL401 vektor sejtenkénti kópiaszáma 10, míg a pWHM3 vektor sejtenkénti kópiaszáma 100 körül van *Streptomyces*-ben. A pHJL401 vektor alapú klónt pSGF4, míg a pWHM3 vektor alapú klónt pSGF5 néven jelöltük. A pSGF4 és a pSGF5 konstrukciót mindkét esetben *S. griseus* 52-1 törzsbe transzformáltuk. Az R5 táptalajon növesztett thiostrepton ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) rezisztens transzformánsokat folyékony szűrt szójas táptalajon vizsgáltuk.

A kontrollként használt *S. griseus* 52-1 törzs folyékony tenyészetében hosszú, egyenes, elágazás nélküli multinukleáris vegetatív hifafonalak képződnek (11.b. ábra). Amennyiben a tisztított C faktor fehérjét ezen törzs 20 óránál fiatalabb tenyészetéhez adjuk, annak reproduktív típusú differenciálódását váltja ki, ami a konidiumot képző *S. griseus* 45H törzshöz (melynek fermentlevéből a C faktor tisztítása történt, 11.a. ábra) hasonló morfológiájú, bazofil citoplazmájú, megvastagodott sejtfalú és a citoplazmában PAS pozitív granulumokat tartalmazó reproduktív alakok megjelenésével jár együtt. A hifafonalak végén ún. reproduktív C-típusú ágak figyelhetők meg, melyek csúcsi része megvastagszik és spórákat képez (Vitális és mtsai., 1963), (11.c. ábra). A C faktor hatás specifikusságára utal, hogy már $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$ koncentrációban kiváltotta a jellegzetes biológiai hatást. A gént alacsonyabb kópiaszámban tartalmazó pSGF4 transzformánsok folyékony szűrt szójas kultúrájában reproduktív elemek képződése figyelhető meg, mely hatás megegyezik az extracellulárisan adott C faktoréval (11.d. ábra). A gént magasabb kópiaszámban tartalmazó pSGF5 transzformánsok citomorfológiai képe a fent említett tenyésztési körülmények között viszont a *S. griseus* 52-1 törzsre jellemzőkkel mutat hasonlóságot (nincs ábrán feltüntetve).

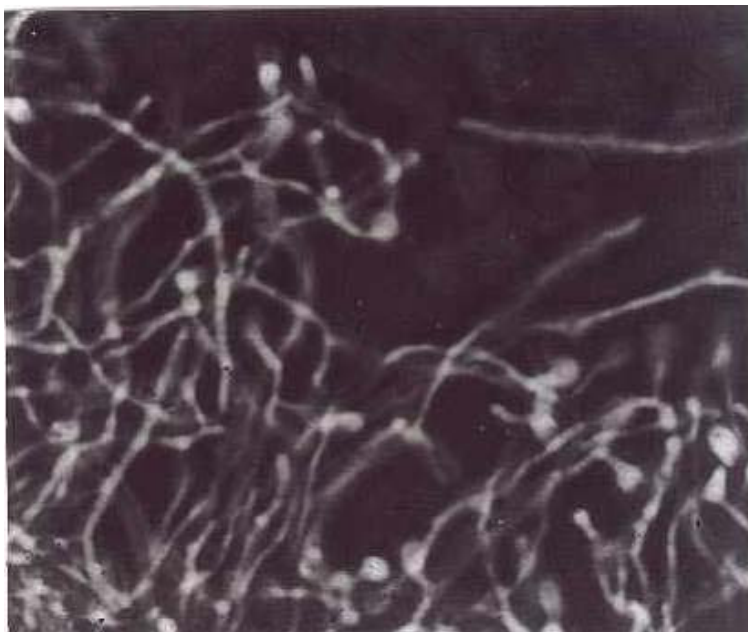
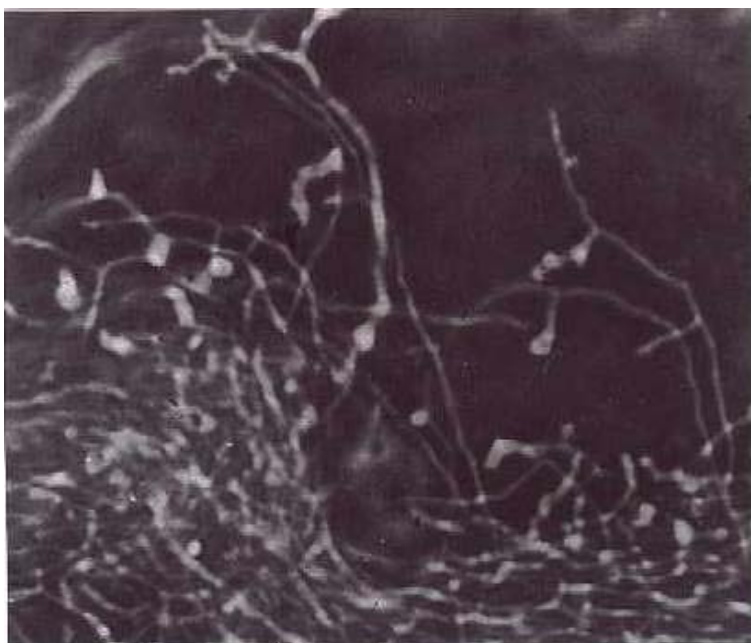
Létrehoztunk egy olyan konstrukciót is, melyben a C faktor gén promóter régiója nélküli 1,6 kb nagyságú fragmentjét a magas kópiaszámú pWHM3 *E. coli*-*Streptomyces* ingázó vektorba, az igen erősen kifejeződő erythromycin (*ermE*) *Streptomyces* promóter mögé klónoztuk. A rekombináns plazmidokat *S. griseus* 52-1 törzsbe transzformáltuk. Mivel többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült transzformánsokat kapnunk, feltételezzük a nagy kópiaszámban erősen kifejeztetett gén letális hatását. Hasonló jelenséget figyeltünk meg az extracellulárisan $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban adott C faktor fehérje esetén is.



a



b

**c****d**

11. ábra (a). *S. griseus* 45H, (b). *S. griseus* 52-1, (c). extracellulárisan adott C faktorról kezelt *S. griseus* 52-1, (d). *S. griseus* 52-1/pSGF4 72 órás folyékony tenyészetének anoptral (negatív fázis-kontraszt) mikroszkópos felvétele.

4.10. A C faktor expressziójának hatása *S. griseus* NRRL B-2682 törzs *bald* mutánsaira

A C faktor hatás további vizsgálatához a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A faktort nem termelő *bald* mutánsát *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN (Penyige András, nem közölt eredmény) használtuk, melybe a pSGF4 illetve pSGF5 klónokat transzformáltuk. A kopasz (*bald*) mutáns törzs szilárd táptalajon nem képez légmicéliumot (12. a. ábra), viszont ebben az esetben szubsztrát micéliumban történő spóráképzés megfigyelhető. A spórák inkább hosszúkásabbak, ami arra utal, hogy az érési folyamaton nem mentek teljesen keresztül. Hasonló jelenség más kopasz mutáns törzsnél is megfigyelhető, így például az irodalmi áttekintésben említett A faktor hiányos mutáns *S. griseus* HH1-ben (Kendrik és Ensign, 1983; Szabó és Vitális, 1992). Az alacsony (pSGF4) és magas (pSGF5) kópiaszámú rekombináns plazmidokat tartalmazó transzformánsokat thiostrepton(50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) tartalmú R5 szilárd táptalajon tenyésztve légmicélium és jelentős spóráképződést figyeltünk meg (12. b., c. ábra). A vad típusú *S. griseus* NRRL B-2682 és mindkét transzformáns spóratermelését fázis-kontraszt mikroszkópban összehasonlítva nem állapítottunk meg észlelhető különbséget, a spórák mindhárom esetben érettek, gömbölyűek.



a

**b****c**

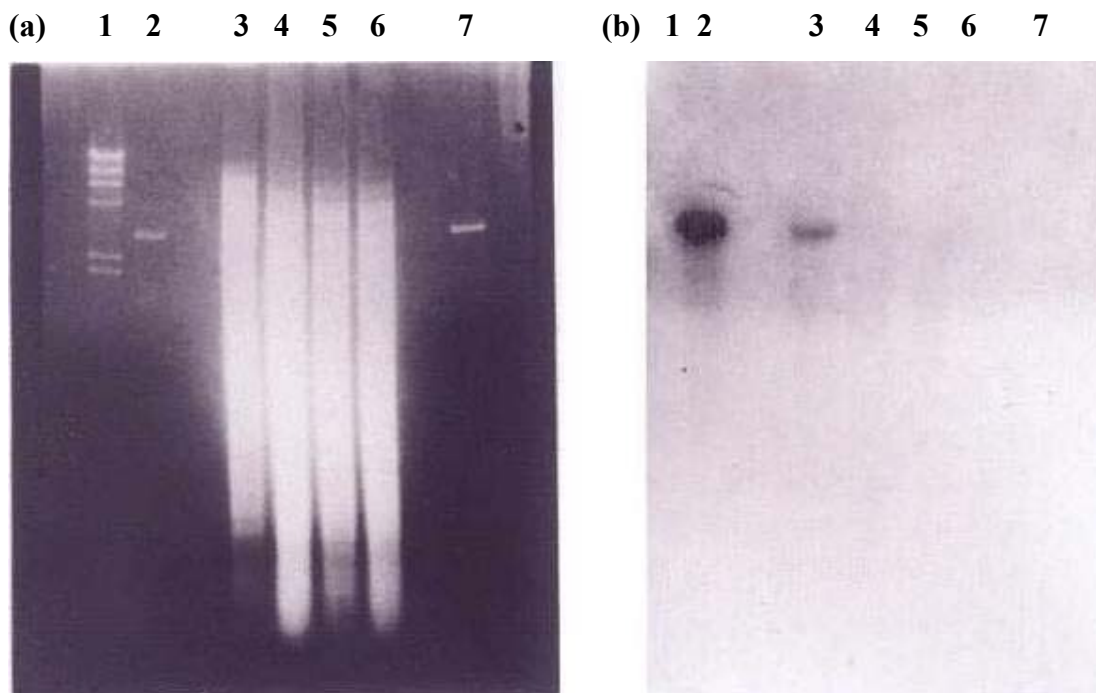
12. ábra (a). Az A faktort nem termelő *bald* mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN és (b) a C faktort alacsony kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF4 illetve (c). magas kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF5 tartalmazó transzformánsainak 7 napos, R2YE szilárd táptalajon nőtt tenyésztete.

A *S. griseus* NRRL B-2682 jól spórázik folyékony tápközegben. Korábbi vizsgálatunk során azon *Streptomyces* törzsekben tudtuk a C faktorról nagyfokban homológ ($\cong 87\%$) gént detektálni, melyek jól spóráznak folyékony táptalajon, ilyen pl. a *S. albus* és a *S. flavofungini*. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a C faktornak fontos szerepe van a sporuláció iniciálásában folyékony tápközegben.

A fent említett vad típusú illetve a kopasz mutáns *S. griseus* kromoszómális DNS-ének analízisével ellenőriztük a C faktor gén meglétét a két törzsből. A *S. griseus* NRRL B-2682 és spontán *bald* mutánsának *S. griseus* NRRL B-2682*bld SacII* enzimmel emésztett, 1 %-os agaróz gélen megfuttatott genomiális DNS-ét Hybond N membránra vittük és a próbával 42 °C-on egy éjszakán keresztül hibridizáltattuk. Próbaként a gén - a 4.6. pontban már említett - 860 bp hosszúságú (930-1790 nt), radioaktív foszforral [α^{32} -P] dCTP] jelölt (Megaprime Kit, Amesham) *EcoRV-SalI* fragmentjét használtuk, mely a kódoló régió 80 %-át fedi le. Az alkalmazott legerősebb mosási erősség 0,1xSSC, 0,1 % (w/v) SDS; 65 °C; 30 perc volt.

Annak ellenére, hogy a C faktor mind alacsony, mind magas kópiaszámban komplementálni képes a *bald* mutációt, meglepetésünkre ezekben a törzsekben nem tudtuk kimutatni a C faktor vagy azzal nagyfokban homológ gént (13. ábra).

Ismertek olyan esetek (Gilles P. van Wezel, nem publikált eredmény), mikor az izolált kromoszómális DNS-ben bizonyos gének fehérjével maszkírozva vannak és csak néhány órás proteináz K-val történő kezelés után detektálhatóak. A fent említett vad típusú és *bald* mutáns törzs genomiális DNS-ének többszöri proteináz K-val történő emésztése után sem tudtuk Southern hibridizációval a C faktorról homológ gént kimutatni. Ezt követően PCR reakcióban, a C faktor gén szekvenálása során is használt 8-as és 13-as primerrel, templátként a két *S. griseus* törzs *SacII* enzimmel emésztett kromoszómális DNS-ét használva, megróbáltuk a C faktort vagy azzal homológ gént felszaporítani, de ezzel a módszerrel sem kaptunk pozitív eredményt.



13. ábra (a). Ethidium-bromiddal festett 1 %-os agaróz gél és a (b) Southern blot autoradiogramja. 1. *Hind*III-al emésztett λ DNS, 2. pBZ3 pozitív kontroll, 3. *S. griseus* 45H, 4. *S. griseus* 52-1, 5. *S. griseus* NRRL B-2682, 6. *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN, 7. pBluescript II KS+ negatív kontrol. Próbaként a C faktor gén ^{32}P -vel felölt 860 bázis hosszúságú fragmentjét használtuk.

A kísérletet a *S. griseus* NRRL B-2682 törzs egy A faktort termelő *bald* mutánsával *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP is megismételtük. Ez a típusú spórát nem termelő kopasz mutáns azért különösen érdekes, mert *S. griseus*-ban az A faktornak kulcsfontosságú szerepe van a légmicélium képzés indukálásában. Ebben az esetben az A faktor által kontrollált regulációs kaszkád valamelyik génjében történhetett a mutáció. Az A faktort termelő kopasz mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF4 transzformánsát thiostreptonstrepton ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) tartalmú R5 szilárd táptalajon tenyésztve légmicélium fejlődik és fáziskontraszt mikroszkóposan sok érett gömbölyű spóra figyelhető meg. A C faktort magas kópiaszámban kifejeztetve - *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP-SGF5 - viszont a légmicélium, illetve spóra képzés elmarad (Birkó

Zsuzsa, nem közölt eredmények), a szilárd tenyészet morfológiája az A faktort termelő kopasz mutánsával egyezik meg (14. ábra).



***S. griseus* NRRLB-2682
BAFF**

a



***S. griseus* NRRLB-2682
BAFF/SGF4**

b



***S. griseus* NRRLB-2682
BAFP/SGF5**

c

14. ábra Az A faktort termelő *bald* mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP és (b) a C faktort alacsony kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF4 illetve (c). magas kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF5 tartalmazó transzformánsainak 7 napos, R2YE szilárd táptalajon növesztett tenyésztete.

4.11. Antibiotikum termelés változása alacsony és magas kópiaszámú C faktor gén hatására *S. griseus* törzsekben

A szekunder metabolitok termelése, a morfológiai differenciálódással összefüggésben, szilárd táptalajon a légmicéliumképzéssel párhuzamosan, folyékony tápközegben pedig a kvázi-exponenciális növekedés befejeződése után történik. A szekunder metabolitok közül ipari és gyógyászati szempontból kiemelkedő jelentőségűek az antibiotikumok. Az általunk vizsgált *S. griseus* törzsek, illetve *bald* mutánsaik streptomycint termelnek. Ebben a kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy ezeknek a törzseknek a C faktort alacsony, illetve magas kópiaszámban tartalmazó transzformánsaiban hogyan változik a streptomycin szintézis mértéke, vagyis a C faktor hatással van e a morfológiai diferenciálódással összefüggésben lévő antibiotikum termelésre. Az antibiotikum koncentrációt agar diffúziós módszerrel szűrt szójás

táptalajon növesztett 48 ill. 72 órás tenyészetek fermentlevéből határoztuk meg. A mérés részletes leírása az Anyag és módszer fejezet 3.3.10. pontjában olvasható.

Az első sorozatban *S. griseus* 45H törzsben, melyből a C faktor tisztítása történt, a C faktort nem termelő *S. griseus* 52-1 törzsben és annak két transzformánsában: a C faktort alacsony kópiaszámban kifejeztető *S. griseus* 52-1/SGF4-ben és a C faktort magas kópiaszámban kifejeztető *S. griseus* 52-1/SGF5-ben határoztuk meg a streptomycin koncentrációt. A mérési eredmények a 2. táblázat A. részében vannak összefoglalva. Az antibiotikum koncentrációkat összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a C faktor gént nem tartalmazó, viszont streptomycint jól termelő *S. griseus* 52-1 törzs, illetve a C faktort mind alacsony, mind magas kópiaszámban hordozó transzformánsainak fermentlevében a fent említett antibiotikum közel azonos koncentrációban mutatható ki.

A második mérési sorozatban pedig a C faktort szintén nem termelő *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzsnek, A faktort nem tartalmazó *bald* mutánsának, illetve a *bald* mutáns C faktort alacsony kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF4 és magas kópiaszámban *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF5 tartalmazó transzformánsainak antibiotikum koncentrációját határoztuk meg. A mérési eredmények a 2. táblázat B. részében tekinthetők meg. Ebben az esetben sem a vad típusú törzs, sem pedig a *bald* mutánsa nem termel streptomycint. A *bald* mutáns C faktort tartalmazó mindkét transzformánsának fermentlevében körülbelül azonos mértékben, jelentősen megnövekedett a streptomycin szintje.

A harmadik sorozatban ugyanazt a vad *S. griseus* törzset használtuk mint az előző esetben, viszont most egy olyan *bald* mutánsát *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP választottuk, mely termel A faktort. A *bald* mutáns transzformánsai: *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF4 és *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF5 a C faktort alacsony illetve magas kópiaszámban tartalmazzák. A kapott antibiotikum koncentrációk értékei a 2. táblázat C. részében találhatóak. A vad típusú *S. griseus* törzs és A faktort termelő *bald* mutánsa nem szintetizál ezzel a módszerrel kimutatható mennyiségű streptomycint. A C faktort kis példányszámban hordozó transzformás esetén mind a 48, mind pedig a 72 órás tenyészet fermentlevében jelentősen megnőtt az antibiotikum koncentráció, míg a C faktort nagy példányszámban tartalmazó transzformáns fermentlevében antibiotikum nem mutatható ki (Birkó Zsuzsa, nem közölt eredmények).

A

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> 45H	0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.23 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> 52-1	14 $\mu\text{g ml}^{-1}$	11.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> 52-1/SGF4	7.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> 52-1/SGF5	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	12 $\mu\text{g ml}^{-1}$

B

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFN	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFN/SGF4	8.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	11 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFN/SGF5	11 $\mu\text{g ml}^{-1}$	12 $\mu\text{g ml}^{-1}$

C

<i>S. griseus</i> törzs neve	48 órás tenyészet	72 órás tenyészet
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFP	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFP/SGF4	12 $\mu\text{g ml}^{-1}$	11.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>S. griseus</i> NRRL B-2682 BAFP/SGF5	0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0 $\mu\text{g ml}^{-1}$

2. táblázat Szűrt szójás táptalajon növesztett különböző *Streptomyces* törzsek 48 órás illetve 72 órás tenyészetének fermentlevéből agar-diffúziós módszerrel meghatározott antibiotikum koncentrációja.

4.12. C-terminálisan His-tag jelölt C faktor konstrukciója és expressziója

Streptomyces törzsekben

A továbbiakban terveztük a C faktorra kölcsönható fehérje keresését. Ehhez a vizsgálathoz szükségessé vált nagy mennyiségű C faktor fehérje termeltetése, melyet *Streptomyces* expressziós rendszerben próbáltunk megoldani. A rekombináns plazmid létrehozásához a *Streptomyces*ekben fenttartható pIJ702 vektort használtuk, melyben a melanin (*mel*) operonhoz tartozó *melC1* gént hordozó *SphI*-*BglII* fragmentet PCR reakcióban felszaporított, His-tag jelölt C faktor gén *SphI*-*BglII* fragmentjével helyettesítettük. A *melC1* gén ATG start kodonjának bázishármasa része a pIJ702 vektort csak egy helyen hasító *SphI* enzim felismerő szekvenciájának. Ennek érdekében, hogy a C faktor gén 5' végén *SphI* hasítóhelyet hozzunk létre, PCR reakcióban a gén természetes translációs iniciációs GTG kodonját a *melC1* gén ATG start kodonjával, a leolvasási keretet megtartva helyettesítettük. Ennek következtében az amino-terminális valin metioninra változott. A C faktor gén 3' végére pedig, hogy C-terminálisan His-tag jelölt fehérjét kapjunk, a gén természetes stop kodonját PCR reakcióban a histidint kódoló GTG bázishármasra cseréltük, melyet még öt további GTG bázishármas követ a szintén mesterségesen kialakított TGA stop kodon és *BglII* hasítóhely előtt (3.A táblázat).

A mesterséges C faktor gén létrehozásához PCR reakcióban templátként a 4.9. pontban ismertetett pSGF4 plazmidot használtuk. A felszaporított DNS fragmentet *SphI*-*BglII* enzimekkel emésztettük és a szintén ezzel az enzimpárossal emésztett pSP72 vektorba ligáltuk. A rekombináns plazmidokat *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáltuk. Néhány ampicillin rezisztens klónból plazmidot izoláltunk, a méret és a restriktációs analízis alapján pozitívnak bizonyult rekombináns plazmidokból az *SphI*-*BglII* fragmentet a pIJ702 *Streptomyces* vektorba szubklónoztuk, melynek eredményeként kaptuk meg a pSB9 rekombináns plazmidot.

A pSB9 plazmid tehát a C-terminálisan His-tag jelölt, N-terminálisan pedig 38 aminosav hosszúságú természetes szekréción szignál szekvenciával rendelkező C faktor gént hordozza, melynek expressziója a *mel* operon promóterének kontrollja alatt áll. A pIJ702 alap vektor magas kópiaszámban fordul elő *Streptomyces*ekben, ezért azt gondoltuk, hogy a pIJ702 alapú pSB9 plazmidról a C faktor gén magas szinten fog expresszióra kerülni.

A pSB9 plazmidot sikerült *Streptomyces lividans* TK64 és *Streptomyces griseus* 52-1 törzsbe transzformálni, de többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült a transzformáció a *Streptomyces griseus* 45H szülői törzsbe, melynek fermentlevéből a C faktor fehérje tisztítása történt. Ugyanakkor a fent említett törzsek mindegyike egyaránt jól transzformálható a pIJ702 plazmiddal. Ez az eredmény jó egyezést mutat korábbi kísérleteink adataival, miszerint a *S. griseus* 45H törzs nem transzformálható a magas kópiaszámú, C faktor gént hordozó pSGF5 plazmiddal. A kis kópiaszámú, szintén C faktor gént tartalmazó pSGF4 rekombináns plazmid esetében kaptunk transzformánsokat, de nem bizonyultak életképesnek. A telepek átmérője az átlagosnál kisebb volt, nem termeltek spórát és néhány nap múlva elpusztultak.

A transzformánsok HMM táptalajon növesztett 72 órás tenyészetét lecentrifugáltuk, majd a felülúszóból, illetve a feltárt sejtenyészetből (a fehérje kicsapás módja az Anyagok és Módszerek fejezet 3.3.9. pontjában olvasható) próbáltuk a His-tag jelölt C faktor fehérjét azonosítani. A denaturált fehérje mintákat 12 %-os SDS-PAGE gélen futtatuk meg, majd Western blottal ImmobilonP membránra vittük át és immunológiai detektálással (lásd Anyag és Módszer fejezet 3.3.8. pontjában a 6.-9. lépést) próbáltuk a C faktor fehérjét kimutatni.

Várakozásunkkal ellentétben a felülúszóból származó fehérje mintából nem tudtuk a His-tag jelölt C faktort azonosítani, noha a szekréción szignálszekvenciával rendelkező, a sejtől kiválasztásra kerülő fehérjét eddig minden esetben felülúszóból sikerült tisztítani. A *S. lividans* TK64 és *S. griseus* 52-1 törzsek sejtkivonataiból származó fehérje mintákban viszont a membránon, az immunológiai detektálást követően, a C faktor fehérje tömegének megfelelő magasságban egy-egy halvány csík jelent meg. A His-tag jelölt C faktor tehát mindkét törzsben csak nagyon alacsony

szinten kerül expresszióra. Ezek a csíkok nem voltak láthatóak csak az alap pIJ702 vektort tartalmazó 72 órás feltárt tenyészetek fehérje mintáiban.

A két fent említett *Streptomyces* törzs közül egyik sem tartalmazza a C faktort vagy azzal homológ gént. A *S. griseus* 52-1 teszt törzsünk érzékenyen reagál az extracellulárisan adott C faktorra, mely már 0,5 ng ml⁻¹ koncentrációban helyreállítja a törzs folyékony tápközegben elakadt sporulációját. A pIJL401 vektor alapú, alacsony kópiaszámú pSGF4 és a pIJ702 vektor alapú, magas kópiaszámú pSB9 C faktort tartalmazó rekombináns plazmidokkal külön-külön transzformált *S. griseus* 52-1 törzsekben folyékony táptalajon szintén megfigyelhető ez a komplementáció.

4.13. C-terminálisan His-tag jelölt C faktor konstrukciója és expressziója *E. coli*-ban

Streptomyces expressziós rendszerben nem sikerült nagy mennyiségű His-tag jelölt C faktor fehérjét termeltetnünk, ezért következő kísérletünkben a jobb hatásfok érdekében a *Streptomyces*ekkel rokonságot nem mutató *E. coli* törzs expressziós rendszerét használtuk fel.

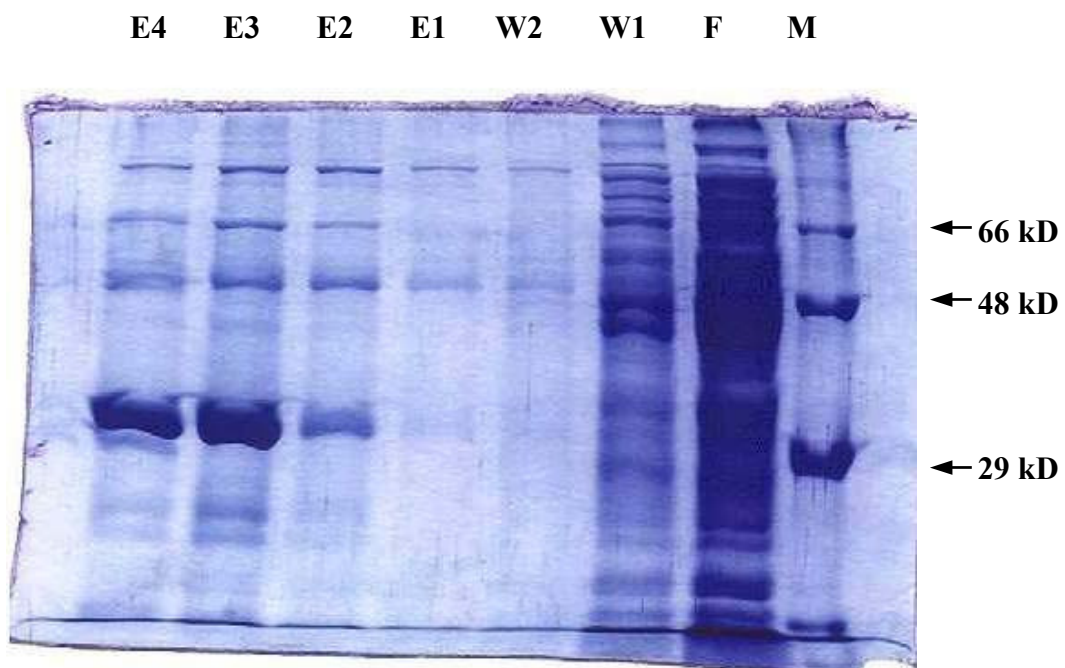
Expressziós vektorként a pQE70 plazmidot használtuk, melynek *SphI*-*Bgl*III poliklónozó helyére a C faktor gén PCR reakcióban felszaporított 897 bp nagyságú szakaszát klónoztuk. Ez a DNS szakasz az érett, szekréción szignálszekvencia nélküli fehérjét kódolja, mert a tisztítás szempontjából előnyösebb, ha a His-tag jelölt C faktor fehérje a sejtben marad. A gén 5' végére PCR reakcióban *SphI* hasítóhelyet szintetizáltunk, melynek ATG bázishármasa a gén mesterséges start kodonjaként szolgál. Az *SphI* hasítóhely létrehozásával a gén 5' végére két aminosavat kódoló bázishármas került, így az érett fehérje N-terminális vége Ala-Val-ról Met-Pro-Ala-Val-ra módosult. A gén 3' végének módosítását a 4.11. pontban leírt módon, ugyanazon visszafelé mutató primer felhasználásával végeztük el (3. B táblázat). PCR reakcióban DNS templátként a pSGF4 plazmidot használtuk.

A felszaporított DNS fragmentet *SphI*-*Bgl*III enzimekkel emésztettük, gélből visszaizoláltuk és a szintén ezzel az enzimpárral emésztett pQE70 vektorba klónoztuk. Ennek eredményeként kaptuk meg a pSB90 rekombinációs plazmidot, melyet először *E. coli* TOP10 törzsbe transzformáltunk, majd néhány ampicillin rezisztens telepből

plazmidot izoláltunk, és amelyik méret és restrikciós analízis alapján pozitívnak bizonyult, *E. coli* M15(pREP4) törzsbe transzformáltuk.

A pQE70 vektorban a His-tag jelölt C faktor gén expressziója az igen erősen kifejeződő T5 fág promóter kontrollja alatt áll. A promóter régiót két *lac* operátor régió szekvenciája követi, mely fokozza a bekötődő *lac* represszor fehérje mennyiségét, így biztosított, hogy indukció nélkül nem kezdődik átírás a promóterről. A *lacI* gén, melyről a represszor fehérje íródik át a pREP4 plazmidon van. Ez a plazmid az M15-ös *E. coli* törzsben található, melybe a His-tag jelölt C faktor gént tartalmazó pSB90 plazmidot is transzformáltuk. A pQE70 plazmidon ampicillin, míg a pREP4 plazmidon kanamycin rezisztencia gén található.

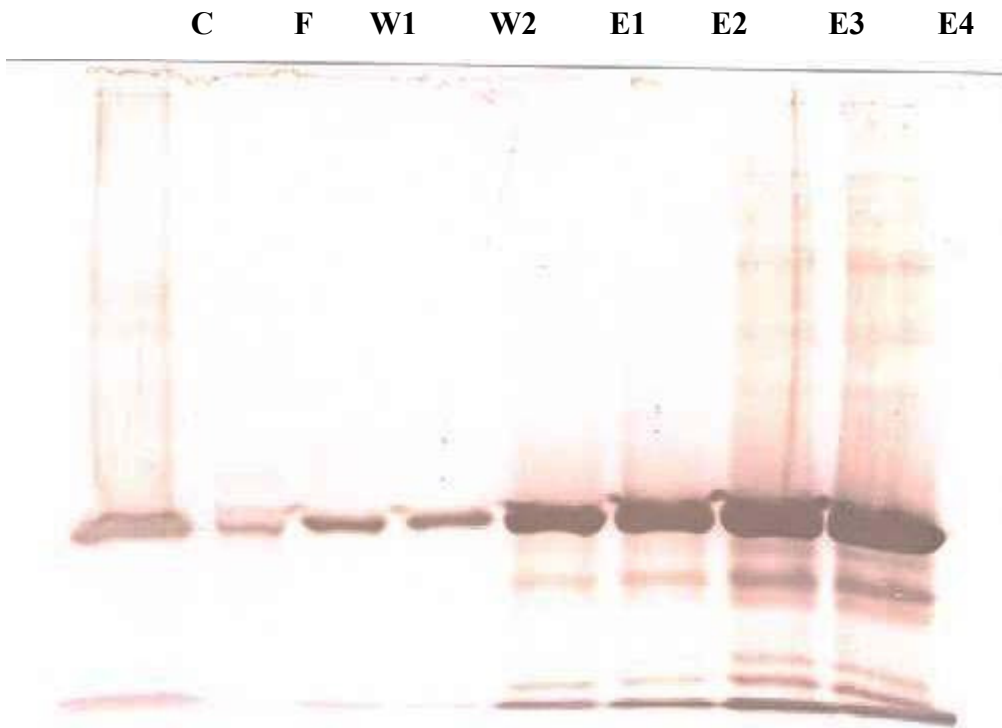
A pSB90 plazmidot tartalmazó M15(pREP4) *E. coli* tenyészetet ampicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) és kanamicyn ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) tartalmú LB folyékony táptalajon egy éjszakán át növesztettük, másnap 100 ml LB táptalajt 5 ml inokulummal beoltottuk, majd a tenyészetet késő exponenciális fázisig, 0.5-ös OD-ig felnövesztettük és 1 mM IPTG-vel indukáltuk, aminek eredményeként *E. coli*ban C-terminális végén His-tag jelölt C faktor termelődik. A termelődő fehérjét natív körülmények között Ni-NTA affinitás oszlopon tisztítottuk (lásd Anyagok és módszerek fejezet 3.3.9. pontjában). A két párhuzamos gél közül az egyiket Coomassie brilliant blue-val festettük, míg a másik gélről a fehérje mintát Western blottal Immobilon P membránra vittük át és anti-His-tag antitesttel illetve C faktor elleni monoklonális antitesttel detektáltuk (15. ábra). A C faktor fehérje tömegének megfelelő magasságban intenzív jelet kaptunk, tehát a C-terminális végén lévő His-tag rész, illetve a fehérje bizonyos epitópjai épek és hozzáférhetőek. Ezzel a tisztítási módszerrel 5-10 mg 90-95%-os tisztaságú His-tag jelölt C faktor fehérjét tudunk izolálni 1 l indukált *E. coli* tenyészetből.



A.



B.



C.

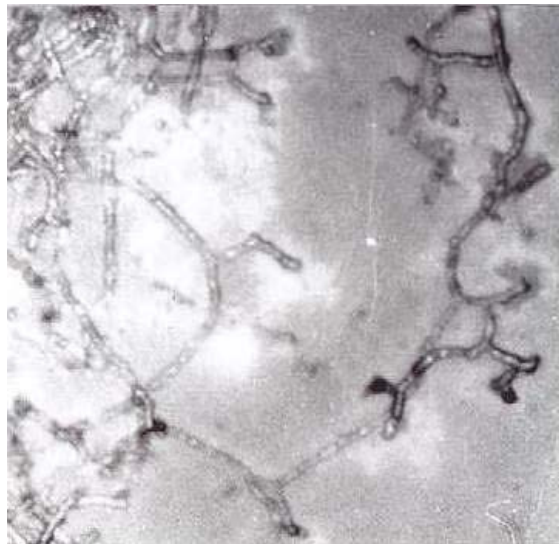
15. ábra Natív körülmények között Ni-NTA oszlopon tisztított, 12 %-os SDS-PAGE gélen futtatott C-terminálisan His-tag jelölt C faktor fehérje (A). Coomassie brilliant blue-val festett gélképe, továbbá Western hibridizációt követően (B). His-tag elleni antitesttel, illetve (C). C faktor elleni monoklonális antitesttel azonosított C faktor fehérje. M. mólsúly standard, F. feltárt tenyészet, W1-W2. mosási lépések, E1-E4. Ni-NTA oszlopról eluált His-tag jelölt C faktor fehérje, *C. S. griseus* 45H tenyészetből tisztított természetes C faktor fehérje.

4.14. His-tag jelölt C faktor fehérje biológiai aktivitásának mérése

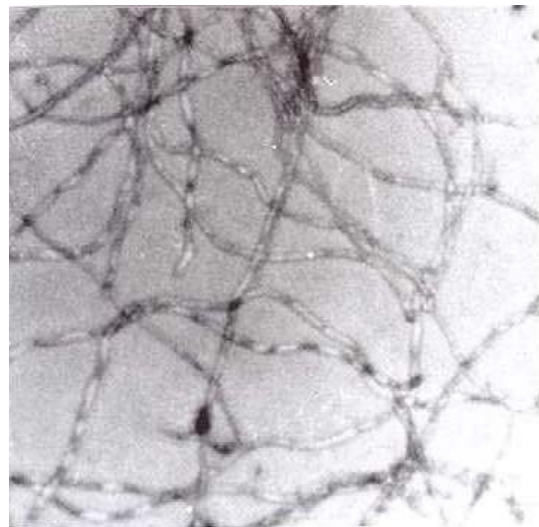
A *Streptomyces*ektől filogenetikailag távol lévő *E. coliban* termeltetett, mesterségesen létrehozott C faktor fehérje biológiai aktivitását az általunk használt citomorfológiai teszttel határoztuk meg. A His-tag-gal fuzionáltatott C faktor fehérjéből kettes léptékű hígítási sorozatot készítettünk, majd pedig az inokulálás időpontjában külön-külön a szűrt szójás táptalajon növesztett *S. griseus* 52-1 teszt törzsünkhöz adtuk. A 72 órás tenyészetből vett mintát glutáraldehiddel fixáltuk és a citomorfológiai változásokat fáziskontraszt mikroszkóp alkalmazásával követtük nyomon. Az eredmény

azonos volt a természetes C faktorról végzett titrálásával, hasonlóképpen már 0.5 ng ml^{-1} koncentrációban kiváltotta a jellegzetes biológiai hatást. A hifafonalak végén a termelő *S. griseus* 45H törzsről jellemző reproduktív C típusú elágazások jelentek meg, melyek csúcsi részein megvastagodott preconidiumok képződtek (16. ábra).

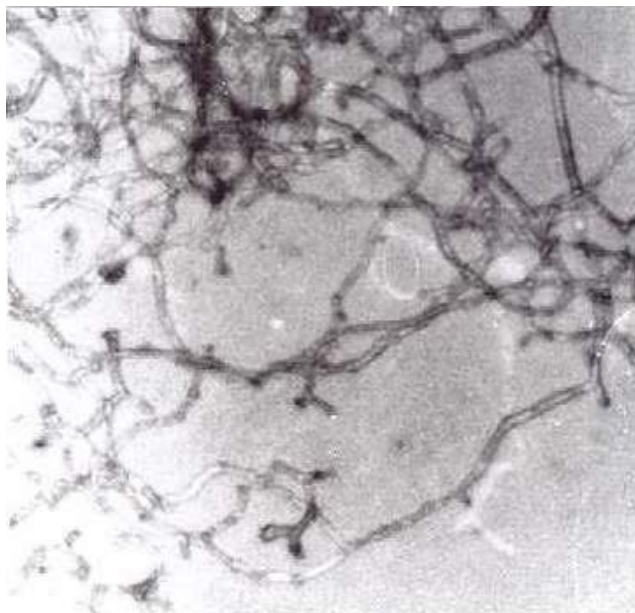
A rekombináns fehérjék tehát, melynek C-terminális végére 6 hisztidint fűzionáltattunk, N-terminális végén pedig Met-Pro aminosavakból álló toldalék van, *in vivo* tesztünkben biológiailag aktívnak bizonyult, így felhasználható további vizsgálataink során, melyek célja *Streptomyces* törzsekben a C faktorról kölcsönható fehérje ill. fehérjék keresése.



a



b

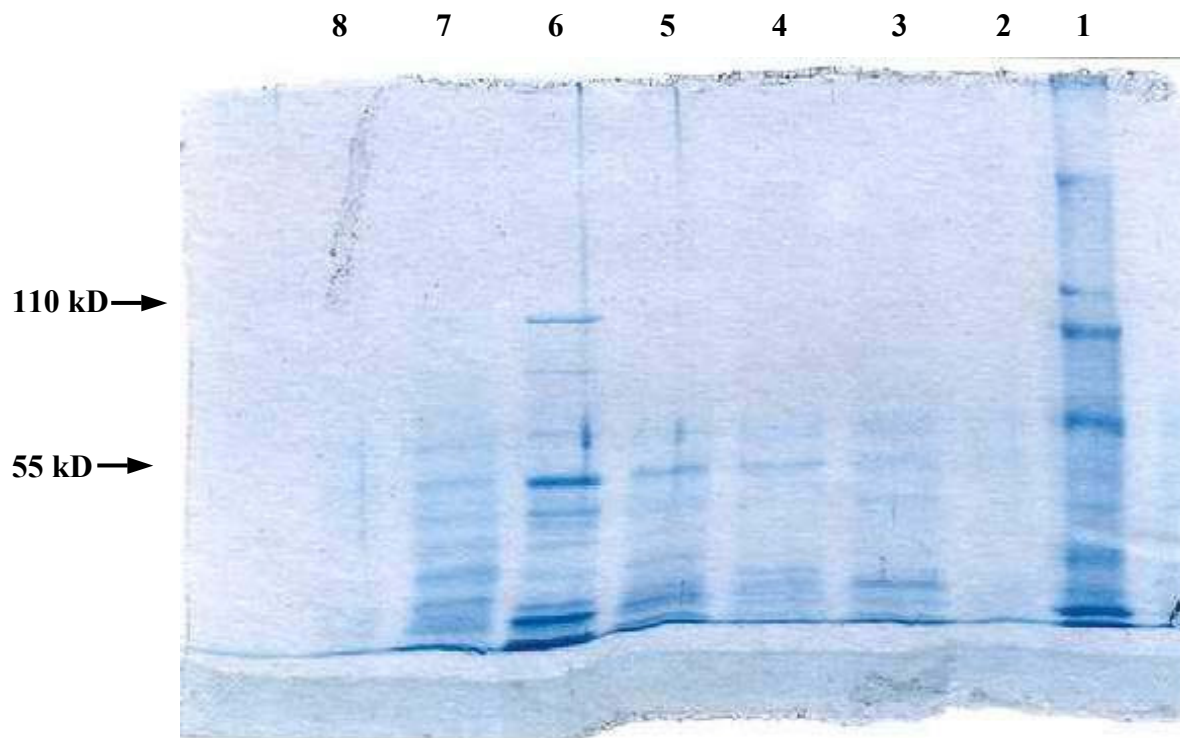


c

16. ábra (a). A C faktort termelő *S. griseus* 45H, (b). *S. griseus* 52-1 teszt törzs, (c). extracellulárisan adott His-tag jelölt C faktorról kezelt *S. griseus* 52-1 72 órás folyékony kultúrájának anoptral (negatív fázis-kontraszt) mikroszkópos képe.

4.15. A C faktorról kölcsönható fehérje illetve fehérjék keresése

A fehérje-fehérje kölcsönhatás tanulmányozásához a *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1 és a *S. griseus* 52-1/pSB9 különböző korú feltárt tenyészetéből a citoszolt és a membrán frakciót egymástól elkülönítve vizsgáltuk (A kísérlet részletes leírása az Anyagok és Módszerek fejezet 3.3.11. pontja alatt olvasható). A *S. griseus* 52-1/pSB9 transzformáns maga termeli a hisztidinnel jelölt C faktort, ezért ebben az esetben ezt nem kellett külsőleg a citoszolhoz ill. a membrán frakcióhoz adnunk. A mintákat 7 %-os SDS-PAGE gélen futattuk és Coomassie brilliant blue-val festettük meg. A His-tag jelölt C faktorról nem kezelt kontrolltól eltérő sávmintázatot viszont csak a citoszollal végzett kísérletek során kaptunk. Ezen belül is a kontrollhoz képest jelentős mértékben fehérje a His-tag jelölt C faktor fehérjével együtt kezelt *S. griseus* 52-1 citoszójából dúsult fel (17. ábra). A kísérletet többször megismételve egy kb. 55 kD és kb. 110 kD méretű fehérje koncentrációja növekedett meg. Jelenleg ezen fehérjék aminosav szekvenciájának és funkciójának azonosítását tervezzük.



17. ábra A C faktorról kölcsönható fehérje ill. fehérjék keresése Ni-NTA oszlophoz való kötődés alapján. Coomassie brilliant blue-val festett 7 %-os SDS-PAGE gél. 1. Molsúly standard, 2. *S. griseus* 52-1 sejt extraktum (24 órás), 3.-4. *S. griseus* 52-1 sejt extraktum (24 órás)+His-tag jelölt C faktor, 5. *S. griseus* 52-1 sejt extraktum (48 órás), 6.-7. *S. griseus* 52-1 sejt extraktum (48 órás)+His-tag jelölt C faktor, 8. *S. griseus* 52-1/pSB9 sejt extractum (48 órás).

5. MEGBESZÉLÉS

A genetika alapvető feladata az élőlények fejlődésének, differenciálódási folyamatának megismerése. A differenciálódás már egyetlen sejten belül is megfigyelhető az életciklus egyes szakaszaiban a különböző funkciókhoz rendelhető eltérő szerkezetek létrehozása során. Intézetünk a differenciálódás tanulmányozására évtizedekkel ezelőtt a *Streptomyces*eket választotta. Bár ez az élőlény prokarióta, fonalas növekedése miatt soksejtű szervezetnek tekinthető, morfológiai differenciálódása az egysejtes formában élő törzsekénél összetettebb, ugyanakkor mikroszkópos és szabad szemmel látható markerek segítségével jól tanulmányozható. E szervezet tanulmányozását továbbá az is indokolta, hogy az Actinomycetesek, mely rendszertani kategóriába a *Streptomyces*ek genera is tartozik, termelik a gyógyászatilag forgalmazott antibiotikumok legnagyobb hányadát. A munkám során az Intézetünkben azonosított C faktornak a differenciálódás és az antibiotikum termelés szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltam.

A *S. griseus* 45H által termelt C faktor fehérje azonosítása és tisztítása a törzs szűrt szójas táptalajon növesztett 72 órás tenyészetének fermentlevéből történt (Szabó és mtsai., 1962). A *S. griseus* 45H jól spórázik folyékony táptalajon, 72 órás tenyészetét fáziskontraszt mikroszkóposan vizsgálva, az elágazó hifafonalak végén ún. C-típusú ágak figyelhetők meg, melyek csúcsi része megvastagszik és conidiumot képez. A C faktor biológiai hatását a folyékony tápközegben nem spórázó *S. griseus* 52-1 törzsen teszteltük: 72 órás tenyészetében a hifafonalak hosszú, egyenes lefutásúak, elágazásmentesek. Abban az esetben, ha a C faktor fehérjét extracellulárisan ezen teszt törzsünk 16 órásnál nem idősebb szűrt szójas folyékony kultúrájához adjuk, már $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$ koncentrációban reprodukív elemek képződését indukálja. A hifafonalak a *S. griseus* 45H szülői törzséhez hasonlóan elágazóvá válnak végükön C típusú ágakkal, melyek megvastagodó csúcsi részéből prekonidium fejlődik. A differenciálódási folyamat ennél a stádiumnál megáll, érett spóra nem termelődik.

A további vizsgálatokhoz elengedhetetlen volt a kutatócsoportunk által azonosított szekrécióna kerülő C faktor fehérje génjének klónozása és szekvenciájának meghatározása.

A C faktor N-terminális végének szekvenálásával azonosított 29 aminosava alapján egy 18 és 19 bázisból álló degenerált oligonukleotidot terveztünk, melyeket PCR reakcióban primerként használtunk fel. A *S. griseus* 45H kromoszómális DNS-ről felszaporított 76 bp hosszúságú fragmentnek a két primer közé eső, a *S. griseus* 45H genommal 100%-ban homológ részét egy kb. 250 klónból álló minigénbank szűrésében próbaként alkalmaztuk. A pozitív pBZ3 jelű klónt egymást követő oligonukleotid primerek szintézisével megszekvenáltuk. A FramePlot analízissel ill. a PC/GENE program segítségével azonosított nyitott leolvasási keret tipikus *Streptomyces* kódoló régió, a DNS G+C aránya magas (71%), a kodonok 3. pozíciójában 96,9%-os valószínűséggel G vagy C bázis található.

Az a tény, hogy a *S. griseus* 45H termelő törzs fermentlevéből tisztítható C faktor fehérje szekrécióna kerül, a gén szekvenciájának ismeretében megerősítést nyert: 38 aminosavból álló szekréción szignálszekvenciája a szignál peptidek első osztályába, ezen belül pedig a twin-arginine motivumot hordozóak alcsoportjához tartozik. A két szomszédos arginint tartalmazó motívum az ún. Tat szekréción úthoz irányítja a fehérjét, mely a Sec transzlokációs úttól eltérően a fehérjéket harmadlagos ill. negyedleges szerkezetük kialakulása után, annak megtartása mellett juttatja át a membránon (Wu LF és mtsai., 2000). Ilyen formában a fehérjék védettebbek a proteázokkal szemben, aminek nagy jelentősége van a más regulátor fehérjékhez hasonlóan csak kis mennyiségben termelődő C faktor esetén. A szekretálódó fehérjék túlnyomó része igen erősen valamilyen cofaktort köt (Blaudeck és mtsai., 2001) vagy más fehérjével képez komplexet, mint például a *Streptomyces antibioticus* tirozináza a transzaktivátorával képez komplexet a transzport előtt (Schaerlaekens és mtsai., 2001). A meghatározott teljes szekvencia ismeretében nem igazolódott az a korábbi feltevésünk, hogy a C faktor egy cink-ujj típusú szabályozó fehérje. Annak érdekében, hogy ezt teljes bizonyossággal kijelenthessük, meghatároztuk a C faktor fehérje minden egyes régióját lefedő néhány triptikus fargmentjének aminosav sorrendjét, ami igazolta a computeres szekvencia analízissel kapott eredményünket. Korábbi megfigyelésünknek valószínűleg az lehet az alapja, hogy cink oszlopon együtt tisztul egy cink-ujj típusú fehérjével, amellyel, a Tat szekréción útvonalon keresztül

kiválasztódó fehérjékre jellemző módon komplexet képez a szekréciót megelőzően vagy pedig a C faktor a cinket, mint cofaktort köti meg.

A *S. griseus* 52-1 törzs folyékony szűrt szójas táptalajon növesztett kultúrájához adott C faktor fehérjét, mely rövid idő alatt eltűnik a tenyészetből, a sejtek valószínűleg felveszik. A C faktor aminosav szekvenciáját különböző computer programokkal- pl. Tmpred (Hofmann és Stoffel, 1993), DAS (Cserzo és mtsai, 1997)- analizálva arra a következtetésre jutottunk, hogy az érett fehérje valószínűleg rendelkezik egy transzmembrán régióval, mely domén a 69. és a 90. aminosav közötti szakaszon található. A fermentlébe kiválasztódó fehérje feltehetőleg a differenciálódás korai stádiumában lévő sejtek membránjába épül úgy, hogy N-terminális vége a sejt belső tere felé, míg C-terminális vége az extracelluláris tér felé mutat.

A C faktor két transzkripciós start ponttal rendelkezik, melyekről azonos gyakorisággal indulhat a transzkripció. A gén átírására csak az élelciklus meghatározott szakaszában kerül sor. Az mRMS szintje jelentősen a sporuláció kezdeti stádiumában lévő *S. griseus* 45H törzs folyékony tenyészetében emelkedik meg. Ez alátámasztja a fent említett *S. griseus* 52-1 teszt törzsünkön végzett kísérlet eredményét, miszerint a C faktor fehérje szerepet játszik a sporuláció bekapcsolásában. A transzkripciós start pont alapján megállapított -35-ös régió szekvenciája nagyfokú, míg a -10-es promóter régió szekvenciája alacsony homológiát mutat a σ^{hrdB} faktor által felismert *Streptomyces* konszenzus promóter szekvenciákkal. A konszenzus szekvenciától való eltérés foka arányos a promóter aktivitás csökkenésének mértékével (Wösten, 1998). A C faktor gén valóban alacsony szinten kerül expresszióra. Korábbi kísérletek igazolták, hogy a *S. griseus* 52-1 tenyészet fermentlévéhez adott $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú C faktor fehérje teljes növekedés gátlást okozott. A C faktor fehérje már $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$ koncentrációban preconidium képzést indukál.

Eddigi ismereteink szerint a σ^{hrdB} túlnyomó részt a vegetatív élelciklusban szerepet játszó gének átírásáért felelős (Wösten, 1998; Strohl, 1992). Azonban vannak kivételek, mint például *S. griseus*ban a reproduktív fázissal összefüggésben lévő légmicéliumképzésben szerepet játszó *amfC* gén, mely promóter régióját szintén a σ^{hrdB} faktor ismeri fel. A szintén nem "háztartási" génként ismert C faktor -10-es promóter régiója

(AACGAT) nagyfokú homológiát mutat az *amfC* gén azonos régiójával (CACGAT; Yonekawa, 1999), a -35-ös promóter régiók között- C faktor (TGGACA), *amfC* (GTCACA; Yonekawa, 1999) nagyobb az eltérés.

A *S. coelicolor*ban végzett *in vivo* promóter próba analízis keretében a C faktor promóter régióját tartalmazó 547 bp hosszúságú szakaszt a pIJ2587 vektorban lévő promóter nélküli *redD* gén elé ligáltuk. A *redD* gén terméke, a vörös színű undecilprodigiosin antibiotikum szintézisét irányító kaszkád utolsó tagja. Abban az esetben, ha a *redD* gén expressziója vegetatív promóterről történik, a képződő vörös pigment szilárd táptalajon a szubsztrátmicéliumban halmozódik fel. A C faktor promóteréről átíródó *redD* gén irányításával képződő undecilprodigiosin viszont a légmicéliumban koncentrálódik, a promóter a légmicéliumképzéssel kapcsolatosan aktiválódik. Ez az eredmény alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a σ^{hrdB} faktor nemcsak vegetatív típusú promóter régiók felismerésében játszik szerepet. A vörös színű antibiotikum csak alacsony szinten termelődött, a légmicélium színe nem olyan intenzív. A rózsaszín árnyalat arra utal, hogy a *redD* gén a C faktor promóteréről csak alacsony szinten expresszálódik.

Az S1 nukleáz térképezés és a promóter próba analízis eredményét összehasonlítva látható, hogy a C faktor promóteréről történő transzkripció mind folyékony, mind szilárd táptalajon a sporulációt megelőző stádiumban történik. A C faktor életciklus függő regulációs szerepe összhangban van korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint fontos a morfológiai differenciálódásban és a spóráképzés iniciálásában (Vitális és Szabó, 1969).

A C faktor fehérje aminosavsorrendjét adatbankokban hozzáférhető fehérjék aminosavsorrendjével összehasonlítva, a *B. subtilis* törzs által termelt SOS regulonhoz tartozó DinC fehérjével találtunk alacsony fokú homológiát (29% aminosav azonosság 6 megszakítással). A *dinC* transzkripcióját a DinR fehérje szabályozza a gén promóter régiójában lévő DinR box-hoz való kötődése révén (Cheo és mtsai., 1991, 1993). A C faktor gén promóter régiójában viszont nem található meg a DinR box Gram pozitív baktériumokban meghatározott konszenzus szekvenciája, ami kétséges teszi, hogy funkcionális szempontból összefüggés lenne a két fehérje között.

A szekvencia analízist követően különböző *Streptomyces* törzsekben teszteltük a C faktor vagy azzal nagyfokban homológ gén jelenlétét. A C faktorra legalább 87%-os homológiát mutató gént tartalmazó *S. albus* 391, *S. flavofungini*, *S. albus* R-55 a többi teszt törzssel ellentétben folyékony tápközegben jól spórázik. Ezen eredményeink ellentétben állnak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a C faktor ellen termeltetett monoklonális antitesttel minden vizsgált *Streptomyces* törzsből, beleértve néhány általunk is vizsgált és most C faktor negatívnak bizonyult törzset, kimutatható volt C faktor szerű antigén jelenléte (Szeszák és mtsai., 1990). Ezen ellentmondó eredmények megítélésénél figyelembe kell venni, hogy a két módszer eltérő alapokon nyugszik. A korábbi megközelítési mód esetén lehetséges, hogy azért volt kimutatható minden vizsgált esetben a monoklonális antitesttel keresztreakáló fehérje, mert az antitest e feltételezés szerint a C faktor fehérjére nem specifikus epitóp ellen készülhetett. A C faktor gén birtokában viszont, a Southern hibridizáció során a gén 80 %-át reprezentáló DNS próbát használtunk, ezen túlmenően pedig 87 %-os azonosságot megengedő mosási lépés beiktatásával csak a C faktor génnel nagyfokban homológokat detektáltuk.

Onaka és mtsai. (1998), a *S. coelicolor* A3(2) törzsből két, a *S. griseus* törzsekben jelen lévő A-faktor receptor fehérjével 35 %-ban azonos fehérjét izoláltak, melyek a szekunder metabolizmus és a morfogenezis szabályozásában játszanak szerepet. Pozitív eredményt csak enyhébb mosási lépések esetén kaptak. A homológia meglétét szekvenálással igazolták. Ez alapján elképzelhető, hogy a mosások erősségének csökkentésével kapható szignálok nem aspecifikus kötődés eredményei, hanem a C faktor génjének szekvenciájával alacsony homológiát mutató géneknek felelnek meg. Így az sem zárható ki teljes bizonyossággal, hogy a Southern hibridizációval negatívnak, monoklonális antitest használata esetén viszont pozitívnak bizonyult *Streptomyces* törzsekben detektált gének valóban homológok a C faktorra. Az eltérő kísérleti eredmények miatt a helyes következtetés levonásához természetesen még további vizsgálatokra van szükség.

A C faktorra legalább 87 %-ban homológ gént hordozó fent említett három *Streptomyces* törzs és a *S. griseus* 45H a többi tesztelt törzssel ellentétben folyékony tápközegben is spórázik (Kendrick és Ensign, 1983; Vitális és mtsai., 1981; Daza és mtsai.,

1989). Feltételezhető, hogy a C faktornak folyékony kultúrában szerepe van a spóráképzés iniciálásában. Hasonló funkciót tulajdonítanak az *ssgA* gén termékének *S. griseus* NRRLB-2682 törzs folyékony kultúrájában (Kawamoto és Ensign, 1995; Kawamoto és mtsai., 1997). Ez a C faktorhoz hasonlóan szintén regulátor szerepet tölt be és egy ismert fehérjével sem mutat szignifikáns homológiát.

A C faktor gént *S. griseus* 52-1 teszt törzsünkben alacsonyabb (kb.10 plazmid/genom) és magasabb (kb.100 plazmid/genom) kópiaszámban is kifejeztettük. A morfológiai differenciálódás szempontjából az extracellulárisan adott C faktorról megegyező hatást csak a gént alacsonyabb kópiaszámban tartalmazó transzformánsok folyékony tenyészetében kaptunk. A hifafonalak elágazóak, a C típusú ágak végén precondidiumok jelennek meg. Ez az eredmény összhangban van az előbbi feltételezésünkkel, miszerint a C faktor folyékony kultúrában közreműködik a spóráképzés indukálásában. A gént magasabb kópiaszámban tartalmazó transzformánsok citomorfológiai képe a *S. griseus* 52-1 törzs jellemző jegyeit mutatja. A hifafonalak egyenes lefutásúak, elágazásokat nem tartalmaznak. A C faktort még nagyobb mértékben, az igen erősen kifejeződő erythromicin promóterről termeltetve pedig a gén letálisnak bizonyult, ami alapján feltételezzük a normális szinttől kb. százszor nagyobb koncentrációban előforduló és az életről függő reguláció alól kikerült gén letális hatását.

A C faktor gén hatását a továbbiakban a *S. griseus* NRRL B-2682 kopasz (*bald*), A faktort nem termelő *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN mutánsán vizsgáltuk, mely törzs szilárd táptalajon nem képez légmicéliumot. A szubsztrát micéliumban ebben az esetben viszont képződnek spórák, a spórák azonban éretlenek. A gént alacsony és magas kópiaszámban tartalmazó transzformánsok differenciáltsági foka megegyezik a vad típusú törzsével, légmicéliumot és érett, gömbölyű spórákat képeznek. Ebben az esetben a C faktor mind alacsonyabb, mind magasabb szinten termeltetve komplementálta a *bald* mutációt. A C faktorról homológ gént azokban a *Streptomyces* törzsekben azonosítottuk, melyek jól spóráznak folyékony kultúrában. A *S. griseus* NRRL B-2682 jól spórázik folyékony tápközegben, ennek ellenére genomális DNS-ében a C faktorról homológ gént nem tudtunk detektálni. A fehérje tehát úgy képes komplementálni a *bald* mutációt, hogy

génje sem a *bald* mutáns törzsben, sem annak vad típusában nem található meg. A C faktor génjét alacsony illetve magas kópiaszámban egy A faktort termelő, légmicéliumot és spórát nem képző kopasz mutánsba *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP is transzformáltuk, ebben az esetben csak kis kópiaszám esetén megy végig a transzformáns a spóraképzéssel végződő teljes élelcikluson, magas kópiaszámban a transzformáns morfológiája megegyezik az A faktort termelő *bald* mutánséval. A C faktor tehát alacsony kópiaszámban mind az A faktort termelő, mind pedig az A faktort nem termelő *bald* mutáns transzformánsában légmicélium képzést indukál, ezen túlmenően pedig az első esetben helyreállítja a spóra érési, a második esetben pedig a sporuláció teljes folyamatát. Más gén esetében is ismert, pl. az *amfC* gént magas kópiaszámú, az *amfRAB* géncsoportot alacsony kópiaszámú, míg az *orf1590* gént magas illetve alacsony kópiaszámú plazmidről expresszáltatva, hogy képes helyreállítani a légmicélium és spóra képzést A faktort nem termelő *S. griseus* törzsben, a *S. griseus* HH1-ben (Kudo és mtsai., 1995). A C faktorhoz hasonlóan ezek a gének sem illeszthetők be az A faktor által szabályozott regulációs kaszkádba. A C faktor ezen kívül kis példányszámban A faktort termelő *bald* mutáns komplementálására is képes.

A C faktor, egyik lehetséges magyarázat szerint valószínűleg olyan mutáns fehérjét helyettesíthet, mellyekkel szekvencia szintjén nem homológ, viszont funkcionálisan hasonló szerepet tölt be. Ennél azonban valószínűbb, hogy a C faktor a sporulációt érintő defektusok szupresszoraként működik, például azáltal, hogy eddig ki nem fejeződött sporulációs géneket indukál. Mindkét hipotézis viszont azon alapul, hogy a sporuláció regulációja több, egymással kapcsolódó alternatív úton történhet, melyek összetett szabályozási hálózatot alkotnak (Babcock és Kendrick, 1988; Ueda és mtsai., 1993; Kudo és mtsai., 1995).

Annak érdekében, hogy a C faktort ebben a szabályozási rendszerben el tudjuk helyezni, azonosítanunk kell a vele kölcsönható fehérjét ill. fehérjét. A kísérlethez jelentős mennyiségű C faktor fehérjére van szükség, melynek C-terminális végéhez a könnyebb és nagyobb koncentrációban történő tisztítás érdekében 6 hisztidint fuzionáltattunk.

A His-tag jelölt fehérjét a C faktort nem tartalmazó *S. lividans*ban ill. *S. griseus* 52-1 törzsekben, a gént nagy kópiaszámú plazmidról kifejezve próbáltuk túltermeltetni. Detektálható mennyiségű fehérjét azonban többszöri próbálkozás ellenére a fermentléből egyáltalán nem, a feltárt sejttenyészetből is alig tudtunk kimutatni. A C faktor gén expressziója *Streptomyces*ben tehát olyan erősen kontrollált, hogy nem lehet benne a fehérjét nagyobb koncentrációban előállítani, magas szintű expresszióját a sejt nem tolerálja. Ezt támasztja alá az a kísérleti tapasztalatunk is, hogy a termelő *S. griseus* 45H törzs nem transzformálható nagy kópiaszámú, C faktort hordozó plazmiddal. Kis kópiaszám esetén is a kapott telepek átmérője kicsi, életképességük csökkent, spóráképzés nem történik. A citoszolból tehát valószínűleg azért nem sikerült a szekrécióra kerülő fehérje kimutatása, mert az alacsony szintű termelődés miatt kihígul a fermentlében.

E. coli expressziós rendszerben viszont a szekréciós szignálszekvencia nélküli His-tag jelölt C faktor fehérjét 5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban sikerült termeltetni. Az így módon előállított fehérje biológiailag aktívnak bizonyult, *S. griseus* 52-1 folyékony kultúrában nem spórázó, csak vegetatív hifákat képző teszt törzsünkhöz 1 ng ml^{-1} koncentrációban a tenyészet elindításakor adva annak reproduktív típusú differenciálódását indukálja. A hifafonalak végi része prenidiumot képezve megvastagszik. Az *E. coli*ből izolált His-tag jelölt C faktort kölcsönható fehérje illetve fehérjék keresésében felhasználva három különböző *S. griseus* törzset teszteltünk. Jelentős mértékű fehérje dúsulást azonban csak a His-tag jelölt C faktor fehérjével kezelt *S. griseus* 52-1 törzs feltárt tenyészetének citoszoljából kaptunk. Egy 55 kD és egy 110 kD molekulatömegű fehérje tisztult együtt a vizsgált fehérjénkkal a Ni-NTA oszlopról. A második vizsgált törzs, a *S. griseus* 45H esetén, melyből a C faktor fehérje tisztítása történt, valószínűleg azért nem kaptunk a His-tag jelölt C faktor fehérjével nem kezelt kontrolltól eltérő mintázatot, mert itt jelen van a nem His-tag jelölt C faktor fehérje is, és a fehérje-fehérje kölcsönhatás során a jelölt és a természetes C faktor között kompetíció van. A harmadik esetben, a *S. griseus* 52-1/pSB90 transzformánsnál a negatív eredménynek pedig az lehet az oka, hogy a törzsbe bevitt His farkazott C faktor fehérje expressziója jól szabályozott és alacsony szintű, így a vele

kölcsönható fehérje sem mutatható ki az SDS-PAGE gélen futattott fehérje minták festésével.

A morfológiai differenciálódás szabályozására vonatkozó eredményeket áttekintve megállapítható, hogy a C faktor szerepet játszik a légmicélium képzésben szilárd táptalajon, illetve a sporuláció folyamatát is befolyásolja. Folyékony táptalajon preconidium képzést indukál. Mivel a C faktor többféle génben történt mutációt is komplementálni képes, ezért nagy valószínűséggel megállapítható, hogy a differenciálódás reprodukív fázisában a légmicélium illetve spóra képzést érintő zavarok szupreszoraként működik közre. Érdekes módon ezeket a következtetéseket olyan vad típusú törzseken illetve kopasz mutánsain végzett kísérletek eredményei alapján vontuk le, mely törzsek nem tartalmazzák a C faktort vagy azzal nagy fokban homológ gént. A vizsgált fehérjénk ugyanis, a regulátor fehérjékre jellemző módon nagyobb koncentrációban, a termelő törzsben a sejtek életképtelenségét okozza. A C faktor szerepe a *Streptomyces*ekben általában véve nem esszenciális, a vizsgált esetek közül csak a folyékony kultúrában is spórázó *Streptomyces* törzsekben fordul elő, ennek ellenére C faktor negatív *S. griseus*ban feltehetően képes eddig ki nem fejeződött géneket indukálni.

A morfológiai differenciálódással összefüggő antibiotikum termelésre a kísérletek eredményeit összegezve a C faktor a következő módon hat: Abban az esetben, ha a transzformálandó törzs (*S. griseus* NRRL B-2682 BAFN, *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP) nem termel streptomycint, alacsony kópiaszámban növeli az antibiotikum koncentrációt, míg magas kópiaszámban a hatása már nem ilyen egységes. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A faktort nem termelő *bald* mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF5 transzformánsában jelentősen megemelkedett, míg A faktort termelő *bald* mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP/SGF5 transzformánsa esetén nem változott az antibiotikum termelés a légmicéliumot nem képző mutáns törzs produkációjához viszonyítva. A különbség valószínűleg nem az A faktor meglétére vagy hiányára vezethető vissza, hiszen az A faktort szintén tartalmazó *S. griseus* 52-1 törzs C faktort alacsony ill. magas kópiaszámban tartalmazó transzformánsaiban egyik esetben sem növekedett a termelés mértéke. A C faktor tehát befolyásolja az antibiotikum szintézis mértékét, de ennek hatásmechanizmusára

a fenti adatok birtokában nem lehet egyértelmű választ adni. Eddigi ismereteink alapján *S. griseus*-ban nehéz példát találni olyan, a szekunder metabolizmust befolyásoló regulátor fehérjére, melynek termelődése A faktor által nem szabályozott. Sok esetben *S. coelicolor*-ban illetve *S. griseus*-ban az A faktortól függetlenül ható homológ gének termékei nem egyformán hatnak a differenciálódás folyamatára a két törzsben. Erre példa az AfsR fehérjének az AfsK Ser/Thr protein kináz által foszforilált alakja, mely *S. coelicolor*-ban a szekunder metabolitok termelését szabályozza (Matsumoto és mtsai., 1994) vagy az *amfC* gén terméke, mely ugyanebben a törzsben légmicélium illetve antibiotikum képzést indukál, míg *S. griseus*-ban mindkét esetben a fehérje csak a légmicélium képzésre van hatással (Ueda és mtsai., 1996; Yonekawa és mtsai., 1999). A morfológiai differenciálódás és a szekunder metabolitok képzése egymással párhuzamos és néhány ponton átfedő folyamat, mely pontokon a regulációban mindkét folyamatot befolyásoló gének illetve termékeik vesznek részt, *S. coelicolor*-ban már több ilyen gént sikerült azonosítani, míg *S. griseus*-ban ez még egy feltárássra váró terület.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az Intézetünkben felfedezett C faktor az első tiszta formában előállított, *Streptomyces*ekben azonosított fehérje természetű autoregulátor. A munka során a C faktort a bevezetésben taglalt szempontok szerint molekuláris genetikai módszerek alkalmazásával vizsgáltuk. Azonosítottuk a C faktor fehérje génjét, meghatároztuk szekvenciáját és a szekvenciából levezethető aminosav sorrendet. Az aminosav sorrend alapján nem igazolódott az a korábbi feltevés, hogy a C faktor cink-ujj típusú szabályozó fehérje. A komputeres analízist kiegészítve meghatároztuk a fehérje néhány, a szekvencia jelentős részét lefedő, triptikus fragmentjének aminosav sorrendjét is. A C faktor fehérje kiválasztásra kerül a sejtéből, a 38 aminosavból álló szekréción szignálszekvenciájában található twin-arginin motívum valószínűleg a Sec független Tat transzlokációs útvonalhoz irányítja, mely a Sec szekréción úttól eltérően a fehérjéket harmadlagos illetve negyedleges szerkezetük kialakulása után és ezt megtartva választja ki a sejtéből. Az érett fehérje valószínűleg rendelkezik egy transzmembrán régióval, amin keresztül képes a differenciálódás korai stádiumában lévő hifák membránjába integrálódni úgy, hogy N-terminális vége a sejt belső tere felé, míg C-terminális vége az extracelluláris tér felé mutat. A C faktor fehérje egyetlen eddig ismert és adatbankokban hozzáférhető fehérjével sem mutat szignifikáns homológiát. Előfordulása a *Streptomyces*eken belül nem általános, génjét illetve a vele nagyfokban homológ gént csak folyékony tápközegben jól spórázó törzsekben sikerült kimutatni. A fehérje termelése életciklus függő, az mRNS szintje a sporulációt megelőző stádiumban emelkedik meg. Meghatároztuk a transzkripció start pontot, ami alapján megállapított -10-es és -35-ös promóter régió szekvencia homológiája szerint, a gén átírásában valószínűleg a σ^{hrdB} faktor játszik szerepet.

A C faktor morfológiai differenciálódás szabályozásában betöltött szerepére vonatkozólag megállapítható, hogy szilárd táptalajon C faktort nem termelő *S. griseus* NRRLB-2682 kópsz mutánsában, különböző génekben történt defektus esetén is, légmicélium képzést indukál, illetve befolyásolja a sporuláció folyamatát. Folyékony tápközegben pedig, az ilyen körülmények között nem spórázó, C faktor génjét szintén nem tartalmazó *S. griseus* 52-1 teszt törzsünkben precondidium képzésben játszik szerepet. A C faktor nagy valószínűséggel a légmicélium illetve spóra képzést érintő zavarok szupresszoraként működik közre, de még nem ismert, hogy mely regulációs kaszkád tagjaként. Annak érdekében, hogy a vele kölcsönható fehérjét, illetve

fehérjéket azonosítani tudjuk létrehoztuk a C faktor C-terminálisan His-farkazott változatát, melyet nagyobb mennyiségben csak *E. coli* expressziós rendszerben tudunk termeltetni. A *S. griseus* 52-1 törzsből egy 55 és egy 110 kD molekulatömegű a C faktorra feltehetően kölcsönható fehérjét sikerült azonosítani.

Az antibiotikum szintézisre gyakorolt hatásáról megállapítható, hogyha a transzformálandó törzs eredetileg nem termel streptomycint, akkor a C faktor alacsony kópiaszámban fokozza az antibiotikum termelést, magas kópiaszámban hatása már nem ilyen egyértelmű. Abban az esetben, ha a transzformálandó törzs eredetileg termel streptomycint, a C faktor sem magas, sem alacsony kópiaszámban nem növeli a szintézis mértékét.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Biró Sándornak, hogy lehetővé tette számomra ennek a témának a kutatását, útmutatásait, hogy munkámat figyelemmel kísérte és segítette.

Köszönöm Dr. Szeszák Ferencnek a tisztított C faktor fehérjét, Dr. Vitális Sándornak a fázis-kontraszt mikroszkópos felvételek készítését és tanácsait.

Köszönöm Gilles van Wezelnek értékes tanácsait, s hogy laboratóriumában megtanulhattam az S1 nukleáz térképezést.

Köszönöm Ulrich Kellernek hasznos ötleteit, s hogy laboratóriumában elsajátíthattam különböző fehérje vizsgálati módszereket, munkatársainak türelmét, segítségét.

Köszönöm Dr. Kiss Ákosnének, Szabó Katalinnak, Solymosi Líviának a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét.

Köszönöm Schmelczer Ivánnak és Kosztolányi Katalinnak az ábrák elkészítéséhez nyújtott segítségét.

Köszönöm a Humángenetikai Tanszék munkatársainak támogatását.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1. Hivatkozások

- Aínsa J. A., Ryding N. J., Hartley N., Findlay K. C., Bruton C. J., Chater K. F. 2000. WhiA, a protein of unknown function conserved among Gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 182(19): 5470-5478.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Babcock M. J. and Kendrick K. E. 1988. Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170: 2802-2808.
- Babcock M. J., Kendrick K. E. 1990. Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene* 95: 57-63.
- Biró S., Békési I., Vitális S., Szabó G. 1980. A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Biochem.* 103: 359-363.
- Blaudeck N., Sprenger G. A., Freudl R., Wiegert T. 2001. Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. *Journal of Bacteriology* 183 (2): 604-10.
- Blight M. A. and Holland I. B. 1990. Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* 4: 873-880.
- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bullock W. O., Fernandez J. M. and Short. J. M. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376.
- Champness W. 2000. Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. *In Prokaryotic Development*, pp. 11-31. Edited by Brun Y. V. and Shimkets L. J. Washington DC: American Society for Microbiology.

- Chater K. F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In *Microbial Development*, pp. 89-115. Edited by Losick R. and Shapiro L. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Chater K. F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* 5 (11): 372-377.
- Chater K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 685-713.
- Chater K. F. 1998. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 144: 1465-1478.
- Chater K. F. 2000. Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In *Prokaryotic Development*, pp. 33-48. Edited by Brun Y. V. and Shimkets L. J. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Chater K. F., Losick R. 1997. The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as Multicellular Organisms*, pp. 149-182. Edited by Shapiro J. H. and Dworkin M. Oxford University Press, New York, N. Y.
- Cheo D. L., Bayles K. W. and Yasbin R. E. 1991. Cloning and characterisation of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173: 1696-1703.
- Cheo D. L., Bayles K. W. and Yasbin R. E. 1993. Elucidation of regulatory elements that control damage induction and competence induction of the *Bacillus subtilis* SOS system. *Journal of Bacteriology* 175: 5907-5915.
- Cserzo M., Wallin E., Simon I., Von Heijne G. and Elofsson A. 1997. Prediction of transmembrane alpha helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* 10 (6): 673-676.
- Daza A., Martin J. F., Dominguez A. and Gill J. A. 1989. Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged culture after a nutritional downshift. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2483-2491.
- Flärdh K., Findlay K. C., Chater K. F. 1999. Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 145: 2229-2243.
- Floriano B. and Bibb M. J. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 21: 385-396.

- Grant S. G. N., Jessee J., Bloom F. R. and Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-4649.
- Guijarro J., Santamaria R., Schauer A. and Losick R. 1988. Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. J. Bacteriol. 170: 1895-1901.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557.
- Hara O., Beppu T. 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*- the role of A factor. J. Antibiot. 35: 349-358.
- Hawley D. K. and McClure W. R. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res. 11: 2237-2255.
- Hoffman K. and Stoffel W. 1993. Tmbase-A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347: 166.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. and Schrempf H. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation.
- Horinouchi S. and Beppu T. 1992. Autoregulatory factors and communication in Actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 46: 377-98.
- Horinouchi S. 1996. *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. FEMS Microbiology Letters 141: 1-9.
- Horinouchi S. 1999. γ -Butyrolactones that control secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, pp. 193-207. Edited by Gray M., Dunny M. and Winans S. C. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Janssen G. R., Bibb M. J. 1993. Derivatives of pUC18 that have *Bgl*II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. Gene 124: 133-134.
- Katz E., Thompson C. J., Hopwood D. A. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans* 66. J. Gen. Microbiol. 129: 2703-2714.

- Kawamoto S. and Ensign J. C. 1995. Cloning and characterisation of a gene involved in regulation of sporulation and cell division *Streptomyces griseus*. *Actinomycetes* 9: 136-151.
- Kawamoto S., Watanabe H., Hesketh A., Ensign J. C. and Ochi K. 1997. Expression of the *ssgA* gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 143: 1077-1086.
- Kendrick K. E., Ensign J. C. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *Journal of Bacteriology* 155(1): 357-366.
- Khokhlov A. S., Tovarova I. I., Borisova L. N., Pliner S. A., Schevchenko L. A., Kornitskaya E. Y., Ivkina N. S., Rapoport I. A. 1967. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 177: 232-235.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Kudo N., Kimura M., Beppu T., Horinouchi S. 1995. Cloning and characterization of a gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* 177 (22): 6401-6410.
- Kwak J. and Kendrick K. E. 1996. Bald mutants of *Streptomyces griseus* that prematurely undergo key events of sporulation. *Journal of Bacteriology* 178(15): 4643-4650.
- Kwak J., McCue L. A., Trezianka K. and Kendrick K. E. 2001. Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. 183(10): 3004-3015.
- Larson J. L., Hershberger C. L. 1986. The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid* 15: 199-209.
- Lezhava A., Kameoka D., Sugino H., Goshi K., Shinkawa H., Nimi O., Horinouchi S., Beppu T., Kinashi H. 1997. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* 253: 478-483.
- MacNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H., MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111: 61-68.

- Matsumoto A., Hong S-K., Ishizuka H., Horinouchi S., Beppu T. 1994. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 146: 47-56.
- Mauël C., Young M., Karamata D. 1991. Genes concerned with synthesis of polyglycerol phosphate, the essential teichoic acid in *Bacillus subtilis* strain 168, are organized in two divergent transcription units. *J. Gen. Microbiol.* 137: 929-941.
- Mauël C., Young M., Monsutti-Grecescu A., Mariott S. A., Karamata D. 1994. Analysis of *Bacillus subtilis tag* gene expression using transcriptional fusions. *Microbiology* 140: 2279-2288.
- McCue L. A., Kwak J., Babcock M. J., Kendrick K. E. 1992. Molecular analysis of sporulation in *Streptomyces griseus*. *Gene* 115: 173-179.
- McCue L. A., Kwak J., Wang J., Kendrick K. E. 1996. Analysis of a gene that suppresses the morphological defect of *bald* mutants of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* 178 (10): 2867-2875.
- Merrick M. J. 1976. A morphological and genetic mapping study of *bald* colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 96: 229-315
- Miyake K., Horinouchi S., Yoshida M., Chiba N., Mori K., Nogawa N. 1989. Detection and properties of A-factor-binding protein from *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* 171: 4298-4302.
- Molle V., Palframan W., J., Findlay K., C., Buttner M., J. 2000. WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 182 (5): 1286-1295.
- Murray M. G. 1986. Use of sodium trichloroacetate and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping. *Anal. Biochem.* 158: 165-170.
- Nagarjan V. 1993. Protein secretion. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, pp. 713-726. Edited by Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Narva K. E., Feitelson J. S. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 172: 326-333.
- Nodvell J. R., McGovern K., Losick R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 22: 881-893.

- Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* 34: 102-111.
- Onaka H., Ando N., Nihira T., Yamada Y., Beppu T. and Horinouchi S. 1995. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology* 177: 6083-6092.
- Onaka H., Nakagawa T. and Horinouchi S. 1998. Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 28: 743-753.
- Perego M., Higgins C. R., Pearce S. R., Gallagher M. P., Hoch J. A. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* 5: 173-185.
- Prosser J. I., Gray D. I. and Gooday G. W. 1988. Cellular mechanisms for growth and branch formation in Streptomycetes. *In Biology of Actinomycetes '88*, pp. 316-320. Edited by Y. Okami, T Beppu and H. Ogawara. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Pugsley A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.
- Redenbach M., Kieser H. M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H. and Hopwood D. A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome . *Mol. Microbiol.* 21: 77-96.
- Rudner D. Z., LeDeaux J. R., Ireton K. and Grossman A. D. 1991. The *spoOK* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* 173: 1388-1398.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, Ny: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schaerlaekens K., Schierova M., Lammertyn E., Geukens N., Anne J., Van Mellaert L. 2001. Twin-Arginine Translocation Pathway in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* 183 (23): 6727-32.

- Short J. M., Fernandez J. M., Sorge J. A. and Huse W. D. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acid Res.* 16: 7583-7600.
- Soliveri J. A., Gomez J., Bishai W. R., Chater K. F. 2000. Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology* 146: 333-343.
- Song K. S., Li S., Okamoto T., Quilliam L. A., Sargiacomo M., Lisanti M. P. 1996. Co-purification and direct interaction of Ras with Caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271(16): 9690.
- Strauch E., Takano E., Baylis H. A. and Bibb M. J. 1991. The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 5: 289-298.
- Strohl W. R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research* 20(5): 961-974.
- Szabó G., Barabás G. and Vályi-Nagy T. 1961. Comparison of *Streptomyces griseus* strain which produce streptomycin and those which do not. *Arch. Microbiol.* 40: 261-274.
- Szabó G., Vályi-Nagy T., Vitális S. 1962. A new factor regulating life cycle of *Streptomyces griseus*. In *Genetics of Microorganisms, Proceedings of a Symposium on Heredity and Variability of Microorganisms*, pp. 282-292. Edited by V. D. Timakova. Moscow: State Publishing House of Medical Literature.
- Szabó G., Szeszák F., Vitális S., Tóth F. 1988. New data on the formation and mode of action of factor C. In *Biology of Actinomycetes '88*, pp. 324-329. Edited by Y. Okami, T. Beppu and H. Ogawara. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Szabó G., Vitális S. 1992. Sporulation without aerial mycelium formation on agar medium by *Streptomyces bikiniensis* HH1, an A-factor-deficient mutant. *Journal of General Microbiology* 138: 1887-1892.
- Szeszák F., Vitális S., Tóth F., Valu G., Facht J., Szabó G. 1990. Detection and determination of factor C- a regulatory protein- in *Streptomyces* strains by antiserum and monoclonal antibody. *Arch. Microbiol.* 154: 82-84.
- Szeszák F., Vitális S., Szabó G. 1991. Presence of factor C in Streptomycetes and other bacteria. In *Genetics and Product Formation in Streptomyces*, pp. 11-18. Edited by S. Baumberg, H. Krügel and D. Noack. New York: Plenum.

- Szeszák F., Vitális S., Biró S., Dalmi L. 1997. Amino acid sequence homology of factor C produced by *Streptomyces griseus* with regulatory proteins of zinc finger type. *Acta Biologica Hungarica* 48(3): 265-273.
- Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J. D. H., Bron S. and van Dijl J. M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews.* 64(3): 515-547.
- Ueda K., Miyake K., Horinouchi S., Beppu T. 1993. A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J. Bacteriol.* 175: 2006-2016.
- Ueda K., Umeyama T., Beppu T. and Horinouchi S. 1996. The aerial mycelium-defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3(2). *Gene* 169: 91-95.
- Ueda K., Hsneh C. W., Tosaki T., Shinkawa H., Beppu T., Horinouchi S. 1998. Characterisation of an A-factor responsive repressor for *amfR* essential for onset of aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 180: 5085-5093.
- Umeyama T., Lee P.-C., Ueda K., Horinouchi S. 1999. An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145: 2281-2292.
- Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang YG., Donadio S., Hutchinson CR. 1989. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriol.* 171: 5872-5881.
- Vitális S., Szabó G. and Vályi-Nagy T. 1963. Comparison of streptomycin-producing and nonproducing strains of *Streptomyces griseus*. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 14: 1-15.
- Vitális S. and Szabó G. 1969. Cytomorfological effect of factor C in submerged cultures on the hyphae of *Streptomyces griseus* strain No. 52-1 *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 14: 1-15.
- Vitális S., Biró S., Vargha G., Békési I. and Szabó G. 1981. Differentiation and its regulation in submerged culture of *Streptomyces griseus*. In *Actinomycetes (Zentbl Bacteriol Suppl 11)*, pp. 153-156. Edited by K. P. Schaal and G. Pulverer. New York: Springer.

- van Wezel G. P., White J., Hoogvliet G. and Bibb M. J. 2000. Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2(4): 551-556.
- Willey J., Santamaría R., Guijarro J., Geistlich M., Losick R. 1991. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Cell 65: 641-650.
- Willey J., Schwedock J., Losick R. 1993. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Genes and Development 7: 895-903.
- Wösten M. M. S. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. FEMS Microbiology Reviews 22: 127-150.
- Wu LF, Ize B., Chanal A., Quentin Y., Fichnat G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide -dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2(2): 179-89.
- Yanisch-Perron C., Vieria J. and Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.
- Yonekawa T., Ohnishi Y., Horinouchi S. 1999. Involvement of *amfC* in physiological and morphological development in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Microbiology 145: 2273-2280.

8.2. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

- Birkó Zs.**, Sümegi A., Vinnai A., van Wezel G., Szeszák F., Vitális S., Szabó P. T., Kele Z., Janáky T., Biró S. (1999) Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145: 2245-2253 (IF: 2.7).
- Szabó P. T., Kele Z., **Birkó Zs.**, Szeszák F., Biró S., Janáky T. (1999) Identification of factor C protein from *Streptomyces griseus* by microelectrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 34: 1312-1316 (IF: 3.167).
- Biró S., **Birkó ZS.**, van Wezel G. P. (2000) Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Gen. and Mol. Microbiol.* 78: 277-285 (IF: 1.423).
- Birkó Zs.**, Schauwecker F., Pfennig F., Szeszák F., Vitális S., Keller U., Biró S. (2001) Expression and rapid one-step purification of biologically active His-tagged factor C by Ni⁺ affinity column chromatography. *FEMS Microbiology Letters* 196: 223-227 (IF: 1.673).

Egyéb közlemény

- Sümegi A., **Birkó Zs.**, Szeszák F., Vitális S. and Biró S. (1997) A short GC-rich sequence involved in deletion formation of cloned DNA in *E. coli*. *Acta Biologica Hungarica* 48(3), 275-279 (IF: 0.219).