

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Birkó Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Biró Sándor

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
HUMÁNGENETIKA INTÉZET
Debrecen, 2002**

1. BEVEZETÉS

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 a *Streptomyces*eket választotta. A *Streptomyces*ek az Actinomycetes osztály Actinomycetales rendjének egyik legjelentősebb, legtöbbet tanulmányozott genusát alkotják. Gram pozitív szaprofita talajbaktériumok, a talajok természetes populációjának 1-20%-át képezik. Bár ezek az élőlények prokarióták, fonalas növekedésük miatt soksejtű szervezetnek tekinthetők. Életciklusuk során komplex morfológiai differenciálódáson mennek keresztül, mely 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.

***Streptomyces*ek életciklusa szilárd táptalajon**

Az életciklus szilárd táptalajon a spóra csírázásával veszi kezdetét, a csíracső sejtfalának csúcsi része intenzív növekedésnek indul, a megsokszorozódó genetikai állományt elválasztó harántfalak azonban csak igen ritkán képződnek. A vegetatív micélium a táptalajban nő, sűrűn behálózva azt, ezért szubsztrát micéliumnak nevezzük. Idővel a tápanyag csökkenésének vagy más fiziológiai stressznek, illetve a sejtsűrűség emelkedésének hatására a szubsztrát micélium idősebb részei lizálnak. Ekkor a szubsztrát micéliumra merőlegesen növekedő ún. légmicélium képződik. A hossznövekedés befejeződésével a légmicéliumban szinkron módon sporulációs harántfalak képződnek, melyek egy genomot tartalmazó sejtekre tagolják a hifát. Ez a prespóra állapotnak felel meg. A spórák érése során sejtfaluk megvastagszik, pigmentálódik, alakjuk kerekesebb lesz.

***Streptomyces*ek életciklusa folyékony táptalajon**

Bizonyos *Streptomyces*eknek, így például az általunk tanulmányozott *Streptomyces griseus*nak folyékony táptalajon is spóra képzéssel végződő teljes életciklusa van. A vegetatív fázist a csírázást követően a fonalak elágazásai révén a kvázi exponenciális növekedés jellemzi, melynek végén a fonalak lizálására utaló jel nem nagyon látható. A reproduktív növekedési szakaszban, 30-36 óras kor körül a

fonalak két irányban differenciálódnak tovább, aminek eredményeként öregedő vegetatív fonalak és reproduktív (ún. sporogén) ágak különböztethetőek meg. Az antibiotikum termelés és más szekunder metabolitok termelése erre az életszakaszra esik. A spóráképzés és autolízis szakaszában, a légmicéliumra jellemző harántfalak képződésével a sporogén hifa egy kromoszómát tartalmazó sejtekre tagolódik. Ezt a spórafal kiépülése és a spórák lekerekedése követi. Az előregedett vegetatív hifa autolizál a szakasz végén.

Az életciklus szabályozása *S. griseus*ban

Az életciklus génszintű szabályozásában, a légmicélium, ill. a spóra képzésben különböző regulációs kaszkádok működnek közre, melyek indukálásában a törzsek által termelt különböző molekulák, az ún. autoregulátorok játszanak szerepet. A többféle szabályozó rendszer jelenléte egyfajta túlbiztosítást jelent a *Streptomyces*ek számára, hisz a légmicélium és spóráképzés túlélésükhöz elengedhetetlen. Az általunk tanulmányozott *S. griseus*ban is ismertek olyan kis molekulák, mint például az A faktor, ill. fehérjék, úgymint a dolgozatomban tárgyalt, intézetünkben azonosított C faktor, melyek bizonyítottan regulálják a morfológiai differenciálódást.

Az A faktor által szabályozott regulációs kaszkád modellje

Az A faktor egy γ -butyrolakton gyűrűt tartalmazó molekula, mely autoregulátorként hatva *S. griseus*ban mind a streptomycin termelést, mind a légmicélium képzést már 10^{-9} M koncentrációban indukálja. Az A faktor molekula a vegetatív szakaszt jellemző kvázi-exponenciális növekedés végéig fokozatosan akkumulálódik. A szubsztrát micélium citoplazmájában található A faktor kötő ArpA receptor fehérje A faktor hiányában, homodimer formában 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. A légmicélium formálásában a regulációs kaszkád fontos tagja az *amfR* gén terméke, mely a prokariótákra jellemző két komponensű válasz-regulátor fehérjékkel mutat homológiát. Az AmfR foszforilált, aktív formája transzkripció aktivátorként funkcionálhat. Promótere A faktor szignál

hiányában represszált állapotban van. A represszor szerepét a promóter régióhoz kötődő AdpB fehérje tölti be.

A C faktor kutatás előzményei

A C faktor fehérje azonosítása, tisztítása a *S. griseus* 45H 66-72 órás fermentlevéből történt, mely törzs mind szilárd, mind folyékony tenyészetben teljes életciklussal rendelkezik. Ez az elsőként leírt és tanulmányozott fehérje természetű autoregulátor, melynek molekulatömege SDS gélelektroforézissel 34000 Daltonnak adódott. A C faktor hatás tesztelésére használt *S. griseus* 52-1 differenciálódása folyékony tenyészetben elakad, sem reproduktív hifafonalat, sem spórát nem képez. Amennyiben a C faktort ezen törzs 20 óránál fiatalabb tenyészetéhez adjuk, már 1 ng ml⁻¹ koncentrációban reproductív típusú differenciálódást vált ki. A 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. A C faktor vagy legalábbis egy olyan fehérje, mely a C faktor ellen termeltetett monoklonális antitesttel keresztreakál, minden vizsgált *Streptomyces* törzsben kimutatható volt. Az intézetünkben azonosított C faktor volt az első *Streptomyces*ekben azonosított differenciálódásra ható fehérje természetű autoregulátor.

Streptomycin termelés szabályozása *S. griseus*ban

Az antibiotikum szintézis bekapcsolásában fontos kulcsgén az *adpA*, melynek átírását vegetatív életciklusban a hozzákötődő ArpA receptor fehérje gátolja. Amint az A faktor koncentrációja eléri a 32 nM-os küszöbértéket, receptorához kötődve megszünteti annak represszálo hatását, miután a receptor-A faktor komplex ledisszociált az *adpA* génről. A kaszkád következő tagja az AdpA fehérje által stimulált *strR* gén, melynek fehérje terméke a streptomycin bioszintetikus útra specifikus transzkripció aktivátor. Az StrR a glükózból kiinduló streptomycin bioszintézisében résztvevő valamennyi gén átírását aktiválja.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Streptomyces*ek Gram pozitív, micélialis növekedésű baktériumok, melyek komplex élekciklussal rendelkeznek és ezzel összefüggésben értékes szekunder metabolitokat, így például a gyógyászatban is használt antibiotikumokat termelnek. Az élekciklus génszintű szabályozásában, a légmicélium, ill. spóráképzésben különböző regulációs kaszkádok működnek közre. A *S. griseus* 45H törzsből az intézetünkben azonosított C faktor az első fehérje természetű autoregulátor, mely a *S. griseus* differenciálódásának szabályozásában fontos szerepet játszik.

Kísérleteink során célul tűztük ki:

1. A C faktor fehérjét kódoló gén klónozását, szekvenciájának és szabályozó régióinak meghatározását.
2. Részben Southern hibridizáció alkalmazásával, részben adatbázisok felhasználásával annak megállapítását, hogy a C faktor vagy azzal nagyfokban homológ gén ill. fehérje általánosan megtalálható-e a *Streptomyces*ekben illetve más baktérium törzsekben.
3. A génexpresszió idejének meghatározását.
4. A C faktor gén kifejeztetését alacsony, ill. magas kópiaszámú plazmidról spórázó és differenciálódásában blokkolt *S. griseus*ban folyékony és szilárd táptalajon.
5. A C faktorról kölcsönható fehérje ill. fehérjék keresését.
6. A klónozott C faktor gén hatásának vizsgálatát a *S. griseus* streptomycin termelésére.

3. MÓDSZEREK

A 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. Szilárd táptalajon a kiszélesztett spórából, kopasz mutáns esetén micéliumból kiinduló tenyésztéshez 30 °C-os termosztátot használtunk.

NUKLEINSAV VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Az *E. coli*ból történő plazmid izolálást, a restrikciós emésztéseket, DNS ligálást, agaróz gélelektroforézist, DNS visszaizolálást agaróz gélből, a Southern hibridizációt, *E. coli* transzformálást standard protokollok szerint végeztük. A *Streptomyces*ekből történő kromozómális DNS, alkalikus lízissel történő plazmid izolálást, a törzsek transzformációját (*S. lividans* 1326 transzformációja pIJ702 plazmiddal standard protokoll), az RNS izolálást, S1 nukleáz térképezést egyrészt a Genetic Manipulation of Streptomyces, másrészt pedig a Practical Streptomyces Genetics kézikönyv alapján végeztük.

Minigénbank készítése, szűrése

A minigénbank készítése a *S. griseus* 45H törzsből a pBluescript II KS+ vektor felhasználásával történt. A génbankhoz a *SacII* enzimmel emésztett és agaróz gélen elválasztott kromozómális DNS-nek csak a C faktor gén detektálásához használt 39 bp-os digoxigeninnel jelölt próbával hibridizáló mérettartományba eső fragmentjeit használtuk fel. A kb. 250 klónból álló könyvtár szűrését telephibridizációval végeztük. Az immunológiai detektáláshoz a Dig Nucleic Acid Detection KIT-et (Boehringer Mannheim) használtuk.

DNS szekvenálás és szekvencia analízis

A klónozott DNS fragmentum szekvenciáját a dideoxi termináláson alapuló módszerrel manuálisan ill. ABI 373 automata szekvenátor (Applied Biosystems)

felhasználásával határoztuk meg. A szekvencia analízis PC/GENE, FramePlot, BLAST, DAS, Tmpred szoftverek felhasználásával történt.

FEHÉRJE VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Az SDS-polyakrilamid gél elektroforézist, a gél festését Coomassie brilliant blue-val, a Western blot-ot standard protokoll szerint végeztük.

His-tag jelölt C faktor fehérje termelése E. coli-ban

A szekréción szignálszekvencia nélküli C faktor gén 3'-végén a STOP kodont PCR reakcióban hisztidint kódoló GTG bázishármasra cseréltük, melyet még öt további GTG bázishármas követ. A mesterséges C faktor gént pQE70 expressziós vektorba ligáltuk, majd a rekombináns plazmidokat *E. coli* M15(pREP4) törzsbe transzformáltuk. A His-tag jelölt fúziós fehérje expresszióját IPTG-vel indukáltuk. A termelő fehérjét natív körülmények között Ni-NTA affinitás oszlopon tisztítottuk (Qiagen).

A C faktoral kölcsönható fehérje keresése

A fehérje-fehérje kölcsönhatás tanulmányozásához a *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1 és a *S. griseus* 52-1/pSB90 feltárt 24, 48 és 72 órás tenyészetéből a citoszolt és a membrán frakciót egymástól elkülönítve vizsgáltuk. Az első két törzs citoszoljához ill. membrán frakciójához His-tag jelölt C faktor fehérjét adtunk és 4 °C-on egy éjszakán keresztül együtt inkubáltuk. Másnap mindhárom törzs mintáit Ni-NTA szuszpenzióval kevertük össze, 4 °C-on 2 órán át inkubáltuk, majd oszlopba töltöttük és a His-tag jelölt fehérjét és a valószínűleg hozzá kapcsolódott fehérjét eluáltuk.

ANTIBIOTIKUM KONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

A különböző *S. griseus* törzsek által termelt streptomycin koncentrációjának mérésére az agar diffúziós eljárást alkalmaztam. 100 ml agaros titráló táptalaj felszínén összefüggő *B. subtilis* ATCC 6633 pászitot növesztettünk fel, előzőleg azonban a táptalajból 4-6 mm átmérőjű agar korongokat távolítottunk el, melyekbe eltérő koncentrációjú standard streptomycin oldatokat, ill. az ismeretlen antibiotikum tartalmú fermentlevet vittük fel. Az ismert koncentrációjú standard oldatok koncentrációját és hozzájuk tartozó kioltási gyűrűk átmérőjét szemi logaritmus papíron ábrázolva, a kapott egyenes alapján meghatározható az ismeretlen minták antibiotikum koncentrációja.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1 A C faktor gén klónozása

A C faktor N-terminális végének szekvenálásával azonosított 29 aminosav alapján egy 18 és 19 bázisból álló degenerált oligonukleotidot terveztünk, melyeket primerként használva a *S. griseus* 45H kromoszómális DNS-ről PCR reakcióban egy 76 bp hosszúságú fragmentet szaporítottunk fel. A felszaporított fragmentnek a két primer közé eső 39 bp nagyságú, 5'-végén digoxigeninnel jelölt részét egy kb. 250 klónból álló minigénbank szűrésében próbaként alkalmaztuk, a kiemelt pozitív klónt pBZ3 névvel jelöltük.

4.2 A pBZ3 klón szekvencia meghatározása és szekvencia analízise

A pBZ3 klón szekvenálását a minigénbank készítésekor használt pBluescript II KS+ vektor poliklónozó helyét közrefogó T3 és T7 fág promóterével komplementer primerek felhasználásával kezdtük, majd egymást követő oligonukleotid primerek szintézisével megszekvenáltuk. A Frame Plot analízissel 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.

A gén szekvenciájának ismeretében megerősítést nyert, hogy a C faktor fehérje szekrécióna kerül. 38 aminosavból álló szekrécióna szignálszekvenciája twin-arginin motívumot hordoz, mely a Tat szekrécióna úthoz irányítja a fehérjét. Ennek jellemzője, hogy a fehérjét harmadlagos ill. negyedleges szerkezetük kialakulása után, annak megtartása mellett juttatja át a membránon. 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 meghatározott teljes szekvencia ismeretében nem igazolódott az a korábbi feltevésünk, hogy a C faktor egy cink-ujj típusú szabályozó fehérje. Korábbi megfigyelésünknek valószínűleg az lehet az alapja, hogy cink oszlopon együtt tisztul egy cink-ujj típusú fehérjével, amellyel a Tat szekrécióna útvonalon keresztül kiválasztódó fehérjékre jellemző módon komplexet képez a szekrécióna megelőzően vagy a C faktor a cinket, mint cofaktort köti meg.

A C faktor aminosav szekvenciáját különböző komputer programokkal analizálva - Tmpred, DAS - arra a következtetésre jutottunk, hogy az érett fehérje rendelkezik transzmembrán régióval, mely domén a 69. és a 90. aminosav közötti szakaszon található. A fermentlébe kiválasztódó fehérje feltehetőleg ezen transzmembrán domén segítségével 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.

4.3 Transzkripció start pont azonosítása S1 nukleáz térképezéssel

Az S1 nukleáz térképezéshez próbaként a gén PCR reakcióban felszaporított, ^{32}P -vel végjelölt azon 547 nt hosszúságú szakaszát használtuk, ahol a promóter régiót és a transzkripció start pontot sejtettük. A *S. griseus* 45H TSBS komplett táptalajról NMMP minimál táptalajra való átoltása után 0, 30, 60, 120, 240 és 420 perccel vett mintából RNS-t izoláltunk. Az első gyenge 244-245 nt hosszúságú szignálokat, melyek a transzkripció start pontoknak megfelelő 74.(A), ill. 75. (T) nukleotidot jelölik, az átoltást követően 1 órával detektáltuk. A legerősebb jelet az átoltás után 4 órával, a sporuláció kezdeti stádiumában lévő tenyészetből izolált RNS minta esetén kaptuk, tehát a gén kifejeződése függ a növekedési fázistól. A transzkripció start pont alapján megállapított -35-ös régió szekvenciája nagyfokú, míg a -10-es promóter régióé alacsony homológiát mutat a σ^{hrdB} faktor által felismert *Streptomyces* promóter szekvenciákkal. A konszenzus szekvenciától való eltérés foka arányos a promóter aktivitás csökkenésének a mértékével. A C faktor gén valóban alacsony szinten kerül expresszióra és más autoregulátor fehérjékhez hasonlóan igen alacsony koncentrációban fejti ki biológiai hatását. A folyékony tápközegben nem spórázó *S. griseus* 52-1 fermentlevéhez adva már 0.5 ng ml^{-1} koncentrációban preconidium képzést indukál.

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

A *S. coelicolor*ban végzett *in vivo* promóter próba analízis keretében a C faktor promóter régióját tartalmazó 547 bp hosszúságú DNS fragmentumot a pIJ2587 vektorban lévő promóter nélküli *redD* gén elé ligáltuk. A *redD* gén terméke, a vörös színű undecilprodigiosin szintézisét irányító kaszkád utolsó tagja. Abban az esetben, ha a *redD* gén expressziója vegetatív promóterről történik, a képződő vörös pigment szilárd táptalajon a szubsztrát micéliumban halmozódik fel. A C faktor promóteréről átíródó *redD* gén irányításával képződő undecilprodigiosin viszont a légmicéliumban

koncentrálódik, azaz 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 légmicéliumok 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 promóterről történő transzkripció mind folyékony, mind szilárd táptalajon a sporulációt megelőző stádiumban történik.

4.5 A C faktorra homológ fehérje keresése

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. A C faktor gén promóter régiójában viszont nem található meg a DinR box Gram pozitív baktériumokban meghatározott konszenzus szekvenciája, ami kétségesse teszi, hogy funkcionális szempontból összefüggés lenne a két fehérje között.

4.6 A C faktor gén azonosítása különböző *Streptomyces* törzsekben

A C faktor vagy azzal homológ gén jelenlétét a *S. griseus* 45H törzsen 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 jelölt fragmentjét használtuk, mely a kódoló régió 80 %-át lefedi. 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, ami alapján feltételezhető, hogy a C faktornak folyékony kultúrában szerepe van a spóráképzés iniciálásában. Ezen eredményeink ellentétben állnak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a C faktor ellen termeltetett monoklonális antitesttel minden vizsgált *Streptomyces* törzsben, beleértve néhány általunk ismét vizsgált és most C faktor negatívnak bizonyult törzset, kimutatható volt C faktor szerű antigén jelenléte.

4.7 A C faktor expressziójának hatása *S. griseus* 52-1 törzsben

A C faktor gént *S. griseus* 52-1 teszt törzsünkben alacsonyabb (10 plazmid/genom) és magasabb (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 tenyésztésben kaptunk. A hifafonalak elágazóak, a C típusú ágak végén preconidiumok 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 faktor gént még nagyobb mértékben, az igen erősen kifejeződő erythromycin promóterről termeltetve pedig letálisnak bizonyult.

4.8 A C faktor expressziójának hatása *S. griseus* NRRL B-2682 *bald* mutánsaiban

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 viszont spórázik, 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. 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 helyreállítani 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 spórákat nem képező kopasz mutánsba *S. griseus* NRRL B-2682 BAFP is transzformáltuk, ebben az esetben csak kis kópiaszám esetén megy végig a transzformáns a spóráképzéssel végződő teljes életcikluson, 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.

A C faktor, egyik lehetséges magyarázat szerint valószínűleg olyan mutáns fehérjét helyettesíthet, mellyel 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.

4.9 C-terminálisan His-tag jelölt C faktor expressziója *Streptomyces* törzsekben

A C-terminálisan His-tag jelölt fehérjét a C faktort nem tartalmazó *S. lividans*ban ill. *S. griseus* 52-1 törzsekben, a gént nagy kópiaszámú plazmidról kifejeztetve próbáltuk túltermeltetni. Detektálható mennyiségű fehérjét azonban többszöri próbálkozás ellenére a fermentléből egyáltalán nem, a feltárt sejtenyészetből 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 valószínűleg nem is 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 elválasztódás miatt kihígul a fermentlében.

4.10 C-terminálisan His-tag jelölt C faktor expressziója *E. coli*ban

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 ily 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 reprodukív típusú differenciálódását indukálja. A hifafonalak végi része preconidiumot képezve megvastagszik.

4.11 A C faktorról kölcsönható fehérje ill. fehérjék keresése

Az *E. coli*ból izolált His-tag jelölt C faktort kölcsönható fehérje illetve fehérjék keresésében felhasználva három különböző törzset teszteltünk. Jelentős mértékű fehérje dúsulást csak a His-tag jelölt C faktor fehérjével kezelt *S. griseus* 52-1 törzs feltárt tenyészet citoszol frakciójából kaptunk. Egy 55 kD és egy 110 kD molekulatömegű fehérje tisztult együtt a vizsgált fehérjénkkal a Ni-NTA oszlopon. A második vizsgált törzs, a *S. griseus* 45H esetén, melyből a C faktor fehérje tisztítása történt, valószínűleg

azért nem kaptunk a His-tag jelölt 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 fehérje expressziója jól szabályozott, és alacsony szintű, így a vele kölcsönható fehérje sem mutatható ki.

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

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 egyértelmű. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs A faktort nem termelő *bald* mutáns *S. griseus* NRRL B-2682 BAFN/SGF5 transzformánsában jelentősen megemelkedett, míg az 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 produkciójához 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.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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 C faktor fehérje kiválasztásra kerül a sejtből, a 38 aminosavból álló szekréción szignálszekvenciájában található twin-arginin motívum a Sec független Tat transzlokációs útvonalhoz irányítja, mely a fehérjéket harmadlagos illetve negyedleges szerkezetük kialakulása után és annak megtartása mellett választja ki a sejtől. Az érett

fehérje valószínűleg rendelkezik egy transzmembrán régióval, amin keresztül képes a differenciálódás eltérő, korai stádiumában lévő hifák membránjába integrálódni. 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 elválasztása 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 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* NRRL B-2682 kopasz mutánsaiban, 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 preconidium képzésben játszik szerepet. A C faktor nagy valószínűséggel a légmicélium illetve spóra képzést érintő zavarok szupresszoraként működik közre, de még nem tudott, 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 faktorról kölcsönható fehérjét sikerült azonosítani.

Az antibiotikum szintézisre gyakorolt hatását illetően megállapítható, hogy a C faktor az A faktortól független szabályozási útvonalon keresztül befolyásolja a streptomycin termelés, de ennek hatásmechanizmusára az eddigi adatok birtokában nem lehet egyértelmű választ adni.

A tézisek 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).

Az értekezéshez kapcsolódó elsőszerzős előadások és poszterek

Birkó Zs., van Wezel G., Biró S. (1999) A C faktor gén transzkripciójának vizsgálata és expressziójának hatása a differenciálódásra. *A Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológia Szakosztályának 4. Munkaértekezlete*, Eger (poszter).

- Birkó Zs.**, van Wezel G., Biró S. (1999) Egy sejt differenciálódást szabályozó fehérje transzkripciójának vizsgálata és expressziójának a hatása a *Streptomyces griseus* differenciálódására. *IV. Magyar Genetikai Kongresszus*, Siófok (poszter).
- Birkó Zs.**, Szeszák F., Biró S. (2000) A C faktor génjének transzkripciós és funkcionális analízise *Streptomyces griseus*ban. *A Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológia Szakosztályának 5. Munkaértekezlete*, Sopron (előadás).
- Birkó Zs.** és Biró S. (2001) A differenciálódás szabályozásának vizsgálata *Streptomyces*ekben. *A Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológia Szakosztályának 6. Munkaértekezlete*, Sárospatak (poszter).