

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A FEHÉRJE MONO-ADP-RIBOZILÁCIÓ FIZIOLÓGIAI SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA *STREPTOMYCES COELICOLOR*-BAN**

Szentesiné Szirák Krisztina

Témavezető: Dr. Penyige András, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

**A FEHÉRJE MONO-ADP-RIBOZILÁCIÓ FIZIOLÓGIAI SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA *STREPTOMYCES COELICOLOR*-BAN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Szentesiné Szirák Krisztina okleveles biológia-kémia szakos tanár

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Penyige András, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kiss Antal, az MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2013. április 30. 12 óra, DE OEC Élettani Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Maráz Anna, az MTA doktora
Dr. Szabó Judit, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Maráz Anna, az MTA doktora
Dr. Szabó Judit, Ph.D.
Prof. Dr. Kiss Antal, az MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. április 30. 14 óra Debreceni Egyetem OEC,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. A *Streptomyces coelicolor* A3(2) jellemzése

Az *Actinomycetales* rendbe tartozó *Streptomyces*-ek Gram-pozitív, obligát aerob, fonalas, bonyolult morfológiai és fiziológiai differenciálódási folyamattal rendelkező szaprofita talajbaktériumok. Számos farmakológiailag aktív szekunder metabolitot termelnek – többek között a gyógyászatban használt antibiotikumok kb. háromnegyedét.

A legismertebb *Streptomyces* modell szervezet a *S. coelicolor* A3(2) (a továbbiakban *S. coelicolor*). Szilárd táptalajban növesztve a spórák csírázását követően a csíracső apikálisan növekvő, később elágazó sejtfonalakat – hifákat – hoz létre, melyek szövedéke alkotja a vegetatív micéliumot. A tápanyagmennyiség csökkenésének hatására a stacioner növekedési fázisba lépő, talajban növekvő vegetatív micélium szövedékéből a levegőbe kiemelkedve növekedésnek indul a légmicélium. A hifacsúcs levegő-víz határon való áttörését a hifa felszínén kialakuló, amfipatikus peptidből (pl. SapB) és más felületaktív fehérjékből álló bevonat segíti. Kb. 120 órás növekedése után a légmicélium fonalai hamar elérik végső hosszukat, majd a keresztfalak kialakulásával önálló, egyszeres genetikai állománnyal rendelkező sejtekre, spórákra tagolódnak. A füzereket alkotó spórák fala érésük során megvastagszik, lekerekednek, szárazanyag tartalmuk megnő és pigmentálódnak. A sporuláció bekövetkezésének időpontja táptalajfüggő: tápanyagban gazdag táptalajokon 6-7 nap után, de minimál táptalajon már a 3.-4. napon létrejönnek a spórák. A morfológiai differenciálódás transzkripciós szintű szabályozásában két fő géncsoport, a *bld* gének és a *white* gének termékei vesznek részt. A *bald* (*bld*) mutánsok szilárd táptalajon nem képeznek légmicéliumot és a telepek felszíne ennek következtében bőrszerű, kopasz, a *white* mutánsok csak légmicéliumot hoznak létre. A stacioner növekedési szakaszban kezdetét veszi a szekunder metabolitok (pl. antibiotikumok) termelődésével járó fiziológiai differenciálódás folyamata is. A *S. coelicolor* legalább négyféle antibiotikumot termel, melyek közül a névadó, (lúgos és semleges pH-n) kék actinorhodin táptalajba történő szekréciója jól megfigyelhető. Az actinorhodin γ -actinorhodinná átalakulva szekretálódik a sejtből.

Az antibiotikum termelésre ható regulációs rendszer elég összetett. Az actinorhodin szintéziséért felelős enzimeket kódoló gének a termelést szabályozó (*actII-ORF4*), az actinorhodinnal szembeni rezisztanciát biztosító és az antibiotikum aktív kiválasztásában részvevő fehérjéket kódoló gének együtt alkotják az actinorhodin génklasztert.

1.2. A mono-ADP-riboziláció és a mono-ADP-riboziltranszferáz (ADPRT) enzimek

A fehérjék mono-ADP-ribozilációja filogenetikailag ősi, reverzibilis, sztereospecifikus és kovalens poszttranszlációs módosítás. A **mono-ADP-riboziltranszferáz (ADPRT)** enzim a βNAD^+ -ból származó ADP-ribózt az akceptor fehérje specifikus aminosav oldalláncához kapcsolja a NAD^+ -ban található nagy energiájú *N*-glikozil-kötés kötési energiájának felhasználásával egy nikotinamid molekula és H^+ szimultán felszabadulása közben. A fehérjék ADP-ribozilációja általában inaktíválja a célfehérjét, de aktiváló hatása is lehet. Az akceptor ritkán DNS (az egyes lepkefajokban található pierisinek esetén) vagy kis molekula (pl. rifampicin antibiotikum a *Mycobacterium smegmatis* Arr enzime esetén). Az ADPRT enzimek közül a legismertebbek a bakteriális toxinok, de vírusokban, prokariótákban, archeákban és eukariótákban is számos endogén mono-ADPRT létezik.

Az ismert bakteriális ADPRT enzimek túlnyomó része a toxinok közé sorolható, amelyek a kórokozó sejtől a külvilágba szekretált fehérjékként eukarióta membrán/intracelluláris célfehérjéket ADP-ribozilálnak, de vannak endogén ADPRT-ok is. Az arginin-specifikus ADPRT enzimek a leggyakoribbak, ilyen pl. a kolera toxin is. Az ADPRT enzimekre jellemző nagyfokú szekvenciabeli plaszticitás (ami megnehezíti az ide sorolható enzimfehérjék *in silico* felismerését) ellenére minden eddig ismert ADPRT enzim tartalmaz legalább három konzervált szekvencia motívumot, amelyek az enzim aktív centrumát alkotva a szubsztrát specifikálásban és a NAD^+ megkötésében fontos szerepet játszanak. Az egyik konzervált motívumból, az ún. ARTT hurokból származó utolsó aminosav, a katalitikus glutaminsav (E) a legtöbb ADPRT enzimben azonos, míg a másik két motívumban talált eltérések alapján az ADPRT-ok két nagy osztálya különíthető el. Az R-S-E motívumot tartalmazó enzimek a kolera toxinhoz hasonló enzimek csoportjába, a H-Y-E motívumot tartalmazó enzimek a diftéria toxinhoz hasonló fehérjék csoportjába tartoznak.

A fehérje mono-ADP-ribozilációt a mono-ADP-ribóz-protein glikohidroláz (MARH) enzimek teszik reverzibilissé az ADP-ribóz eltávolításával. A reverzibilis ADP-ribozilációs ciklus létét először a fotoszintetizáló és nitrogén-fixálásra is képes *Rhodospirillum rubrum* baktériumban igazolták (a DRAT/DRAG enzimek szabályozzák a dinitrogén reduktáz enzim működését), azóta is ez a rendszer a legjobban jellemzett. Több baktériumban kimutatták endogén módon ADP-ribozilált fehérjék jelenlétét, de a fehérjék ADP-ribozilációjának fiziológiai jelentőségéről és az endogén ADPRT enzimekről eddig kevés ismeret áll rendelkezésünkre.

1.2. Mono-ADP-riboziláció a *Streptomyces*-ekben

Munkacsoportunk elsőként bizonyította ADP-ribozilált fehérjék jelenlétét Gram pozitív baktériumokban, a *Streptomyces griseus*-ban, majd ezt követően *S. coelicolor*-ban is kimutattuk ezt a fehérje módosítást. Agmatint használva ADP-ribóz akceptorként sikerült kimutatnunk arginin-specifikus ADP-riboziltranszferáz aktivitást is *S. griseus*-ban, de hosszú ideig nem voltak pontos molekuláris ismereteink sem az ADP-ribozilált fehérjékről, sem a módosítást katalizáló enzimekről. Az általunk elsőként azonosított, ADP-ribozilált *Streptomyces* fehérje a glutamin szintetáz volt. Kimutattuk, hogy *S. griseus*-ban az adenililáció mellett az ADP-riboziláció is gátolja az enzim aktivitását. Az ADPRT enzimek gátlószereivel (pl. m-aminofenilboronsav, 3-aminobenzamid) kapott eredményeink arra utaltak, hogy a fehérje ADP-riboziláció fontos szerepet játszhat a morfológiai differenciálódás szabályozásában.

S. coelicolor-ban pedig kimutattuk, hogy a benzamid származékokra való rezisztenciáért felelős *brg* génben mutáns törzsben megváltozik az ADP-ribozilált fehérjék mintázata, az actinorhodin termelése és a légmicélium képzés is. A *brgA* mutáció egy új lokuszra térképeződik az *uraA* gén közelébe.

Egy japán kutatócsoport *S. coelicolor*-ban zajló endogén ADP-riboziláció élettani jelentőségének vizsgálata során affinitás kromatográfiás eljárással négy, cisztein oldalláncon ADP-ribozilált fehérjét azonosított, a MalE-t, BlbKB-t és két periplazmatikus fehérjét. Mind a négy fehérje része egy-egy, tápanyagok transzportfolyamatában résztvevő ABC transzporter komplexnek.

A *S. coelicolor* genom megszekvenálása után szekvencia homológia alapján azonosították a *SCO2860* gént, amelynek terméke, az Arr-sc egy ADP-riboziltranszferáz aktivitású fehérje, a *Mycobacterium smegmatis*-ban levő, rifampicint ADP-riboziláló Arr-ms homológja. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy az Arr-ms a rifampicin rezisztencia kialakulásában betöltött szerepe mellett részt vesz a DNS kettős törés kiváltotta stressz válaszban is. A *S. coelicolor*-ban lévő Arr-sc eddig még felderítetlen biológiai funkciót lát el.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Sok adat gyűlt már össze arról, hogy az ADP-riboziláció jelentős szerepet játszhat a *Streptomyces*-ek fejlődésében és differenciálódásában, de az ADP-riboziltranszferáz enzimekről és az általuk módosított fehérjékről nagyon kevés ismeret áll rendelkezésünkre.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok célja a munkánk alanyaként választott, a *Streptomyces* törzsek között legismertebb modell organizmusban, a *S. coelicolor* A3(2)-ben zajló endogén mono-ADP-riboziláció fiziológiai szerepének megismerése volt.

Munkánk során ezért célul tűztük ki

1. az optimális reakció feltételek beállítását a *S. coelicolor* tenyészet sejt kivonatában levő fehérjék *in vitro* ADP-ribozilálásához.
2. a vad típusú törzsben található ADP-ribozilált fehérjék izolálását és azonosítását.
3. a feltételezhetően ADPRT enzimekként működő fehérjék génjeinek szekvencia-homológiák alapján való azonosítását és a géntermékek *in silico* elemzését.
4. valamely általunk azonosított génnek a genomból való eliminálását, azaz az adott enzimet nem expresszáló null mutáns létrehozását.
5. a létrehozott null mutáns fenotípusának elemzését.
6. a mutáns törzs komplementálását a gén vad, genomiális génkópiájával annak bizonyítására, hogy a fenotípusban bekövetkezett változásokat az ADPRT enzim hiánya okozta.
7. a homológia keresés eredményeként ADPRT-ként azonosított génről bebizonyítani, hogy valóban ADPRT enzimet kódol. Az aktivitás azonosítását a vad típusú és a mutáns törzs citoplazma kivonatában kimutatható ADP-ribozilált fehérjék mintázatának összehasonlításával kívántuk elvégezni.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb tisztaságú vegyszereket használtuk, ez alól kivételt képez a szójaliszt és a csapvíz az SFM táptalajban. A kísérletek során felhasznált baktérium törzsek [*S. coelicolor* A3(2) M145 (vad típusú törzs, nem tartalmaz plazmidot); *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* (mutáns törzs, a gén helyén *apra-oriT* kazetta, jelen munka,); *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr/pWHE1* (komplementált mutáns törzs, a Δ SCO5461 mutációt komplementálja a pWHE1 plazmidon bejuttatott SCO5461 gén, jelen munka); *E. coli* DH5 α /pIJ773 (*apra-oriT* kazettát tartalmaz); *E. coli* BW25113/pIJ790; *E. coli* ET12567/pUZ8002; *E. coli* HB101] az *E. coli* HB101 és az általunk létrehozott *Streptomyces* törzsek kivételével a John Innes Centre (Norwich, UK) törzsgyűjteményéből származnak, és a kísérletekben felhasznált vektorokat (pWHM3 *E. coli*/*Streptomyces* ingázó vektor, St3D11 cosmid (a SCO5461 gént hordozza) is a John Innes Centre (Norwich, UK) biztosította számunkra.

3.2. ADP-ribozilált fehérjék izolálása és azonosítása

Az ADP-ribozilációs reakció optimális feltételeinek beállításához 36 órás korú, SFM táptalaj felszínén, celofánon növesztett *S. coelicolor* M145 tenyészet sejtjeiből készítettünk nyers sejt kivonatot, amelyhez radioaktívan jelölt [³²P]-NAD⁺-ot adtunk szubsztrátként és feleslegben jelöletlen ADP-ribózzal egészítettük ki. Az ADP-ribozilációs reakcióelegyből 5 percnként vett mintákból folyadék szcintillációs módszerrel meghatároztuk a TCA-val kicsapható fehérjékbe történt radioaktív ADP-ribóz beépülés mértékét és időfüggését. A kapott eredmények alapján *S. coelicolor* sejt kivonatokban található ADP-ribozilált fehérjék kimutatásához a fent említett sejt kivonattal megegyező módon kapott sejt kivonatot is kiegészítettük ADP-ribózzal, majd az elegy egyik feléhez jelöletlen NAD⁺-ot adva végeztük az ADP-ribozilációs reakciót, a másik felét pedig szubsztrát adása nélkül inkubáltuk. A két mintából m-aminofenilboronsav affinitás kromatográfiával tisztítottuk az ADP-ribozilált fehérjéket, a tisztított fehérjéket 2D SDS-PAGE-vel elválasztottuk. A 2D gélen a kontrollhoz viszonyítva lényegesen intenzívebb, illetőleg újonnan megjelenő foltokban levő fehérjéket tekintettük enzimatikusan ADP-ribozilált fehérjének. Az egyes foltokat tartalmazó

gélparabokban történt tripszines emésztést követően MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel azonosítottuk a fehérjéket.

3.3. A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* null mutáns elkészítése és komplementálása

Először bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk (PBLAST, PSI-BLAST, StrepDB BLAST programok segítségével) *S. coelicolor* genomjában található, feltehetően ADPRT enzimet kódoló gént, a SCO5461-et. Erre a génre nézve null mutáns előállításához a genomiális allélt egy apramycin rezisztencia kazettára (*apra-oriT* kazetta) cseréltük ki a rekombináción alapuló ReDirect (Rapid Efficient Directed Recombination Time saving) technika alkalmazásával.

A ReDirect módszer során először az *E. coli* DH5 α /pIJ773 törzsből izoláltuk az *apra-oriT* kazettát hordozó a pIJ773 plazmidot, majd emésztettük *Hind*III és *Eco*RI restrikciós enzimekkel. Ezután az *apra-oriT* kazettát tartalmazó plazmid fragmentumot templátként használva a kazettára specifikus primerekkel [amelyek 5' és 3' végének 36-36 nukleotidnyi szakasza megegyezik a SCO5461 gén kódoló szakasza előtti (5') és utáni (3') genomi DNS szekvenciával] PCR-rel a közvetlenül a SCO5461 gén transzlációs start kodonja előtti és stop kodonja utáni szekvenciákkal együtt szaporítottuk fel. A λ RED rekombinációs rendszer génjeit hordozó *E. coli* BW25113/pIJ790 törzset előbb a SCO5461 gént hordozó genomi DNS szakaszt és kanamycin rezisztencia gént tartalmazó St3D11 cosmiddal transzformáltuk, majd a lineáris PCR terméként előállított és tisztított *apra-oriT* kazettát elektroporáltuk a transzformáns sejtekbe. A kétszeresen rezisztens transzformánsokban a cosmidon lévő SCO5461 gén kicserélődött az *apra-oriT* kazettára, létrejött a gént nem tartalmazó St3D11::*apr* cosmid. Mielőtt a *Streptomyces* sejtekbe juttattuk volna a kazettás cosmidot, előbb ellenőriztük PCR-rel, hogy valóban a kazettát tartalmazza a cosmid a megfelelő helyen. A St3D11::*apr* mutáns cosmidot, amely a konjugációt lehetővé tevő *oriT*-t és apramycin rezisztencia gént tartalmazó kazettát továbbá kanamycin rezisztencia gént hordoz, a konjugálást megelőzően a DNS metilációban mutáns *E. coli* ET12567/pUZ8002 törzsbe vittük be. Ezzel lecsökkentettük annak veszélyét, hogy a konjugálással a *Streptomyces* sejtekbe bejutó cosmid DNS-t a *Streptomyces* restrikciós rendszere eliminálja, mielőtt a rekombináció megtörténne. A rekombináns cosmidot hordozó transzformáns *E. coli* ET12567/pUZ8002 sejteket konjugáltattuk a *S. coelicolor* M145 spórákkal, majd apramycinre és kanamycinre szelektálva kiválogattuk a kanamycinre érzékeny és apramycinre rezisztens, kettős átkereszteződésen átesett exkonjugánsokat. A kanamycin érzékeny mutánsokat

egyenként SFM + 50 µg/ml apramycin lemezekre oltottuk le. Végül néhányukból spóra szuszpenziót készítettünk, genomi DNS-t izoláltunk és a PCR-rel ellenőriztük a genomi DNS-ben a gén ill. az *apra-oriT* kazetta jelenlétét/hiányát. Egyet kiválasztva közülük elneveztük *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* null mutáns törzsnek.

A létrehozott null mutáns törzs komplementálásához a pWHM3 *E. coli-Streptomyces* ingázó plazmidba, gyenge lacZ promoter mögé, *Hind*III és *Eco*RI hasító helyek közé *in frame* klónoztuk a PCR-rel felszaporított teljes vad SCO5461 allélt. A ligálás termékeként keletkezett pWH1 plazmidot izoláltuk az *E. coli* HB101 gazdából, majd transzformáltuk vele a *S. coelicolor* Δ SCO5461::*apr* mutáns törzset. A *S. coelicolor* Δ SCO5461::*apr*/pWH1 komplementált mutáns törzset PCR-rel ellenőriztük és fenotípusát különböző táptalajokon összehasonlítottuk a vad és a mutáns törzsével.

3.4. A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns fenotípusának vizsgálata

Morfológiai vizsgálatok:

A mutáns fenotípusának vizsgálatához négy különböző szilárd táptalajon – SFM, SMMS, SMMS+10% szacharóz (a továbbiakban SMMS+) és R5 – tenyésztve a *S. coelicolor* M145 vad fenotípusú törzset, a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutánst és a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1 komplementált mutánst összehasonlítottuk a tenyészetek morfológiai differenciálódását.

Mikroszkópos vizsgálatához SMMS, SMMS+ és R5 táptalajokba szűrt fedőlemezekre növesztett és metanollal fixált 2 és 5 napos tenyészeteken Olympus BX40 fáziskontraszt mikroszkóppal követtük nyomon a morfológiai változásokat. A fent említett táptalajokon szintén fedőlemezekre növesztett vad és mutáns sejtek DNS tartalmát a tenyészetek 2 és 7 napos korában propídium-jodidos festést követően Olympus FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

Antibiotikum termelés vizsgálata:

A vad és a Δ SCO5461::*apr* mutáns törzs spóráit szilárd SMMS, SMMS+ és R5 táptalaj felszínére helyezett fehér steril szűrőkre oltottuk, megakadályozva azt, hogy a micélium belenőjön a táptalajba. Egy hét elteltével a koronggal együtt a tenyészetet is eltávolítottuk a táptalaj felszínéről, lehetővé téve az extracelluláris térbe kiválasztott actinorhodin vizsgálatát.

Az extracelluláris térbe kiválasztott γ -actinorhodin mennyiségének pontos méréséhez folyékony SFM tápoldatban 4 napig tenyésztük a vad törzset és a mutáns törzset. A micélium lecentrifugálása után a felülúszókat 1N HCl oldattal pH=2-3-ra savanyítottuk, majd fél térfogatnyi metanol:kloroform (1:1) elegyével extraháltuk az antibiotikumot. A kloroformos fázis abszorbanciáját 542 nm-en fotométerrel lemértük. A termelt antibiotikum mennyiségét az üledék fehérje tartalmára normáltuk. A fehérje meghatározáshoz a micéliumot ultrahanggal feltártuk és 1 M NaOH oldattal hidrolizáltuk, centrifugáltuk majd a felülúszót semlegesítettük és Coomassie protein assay reagenssel meghatároztuk a fehérjetartalmát.

ADP-ribozilált fehérjék mintázatának összehasonlítása:

A Δ SCO5461::*apr* mutáns-, a vad- és a komplementált mutáns törzs R5 táptalajon nőtt 32 órás tenyészetéből sejtkivonatot készítettünk, és β [adenil-³²P]NAD⁺ szubsztráttal végzett ADP-ribozilációs reakciót követően SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk és a gélből Immobilon P (Millipore, PVDF típusú, 1,45 μ m pórusméretű) transzfer membránra blottoltuk a fehérjéket (semi-dry módszerrel). A megszáritott blot radioaktívan jelölt fehérjéit egy éjszakás exponálás után MolecularDynamics PhosphorImager SI készülék segítségével detektáltuk.

3.5. Bioinformatikai elemzések, felhasznált programok

Az ADP-ribozilált fehérjéket a tripszines emésztéssel előállított peptid fragmentumok mintázatából MALDI-TOF tömegspektrometriás analízist követően az NCBI MASCOT programjával azonosítottuk (Matrix Science; [URL: <http://www.matrixscience.com>]).

A *S. coelicolor* genomjában található ADPRT enzimeket kódoló gének keresését, a géntermékek aminosav szekvenciáinak pozíció-érzékeny összehasonlítását az NCBI honlapján található PSI-BLAST software [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>] segítségével végeztük el.

A SCO5461 fehérje aminosav szekvenciáját többszörös szekvenciaillesztéssel hasonlítottuk össze a SCO5461 gén orthológjainak termékével és a további homológ fehérjékkel. Az elemzést ClustalW2 programmal végeztük el [URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>], és a Boxshade 3.31 program segítségével emeltük ki a konzervált aminosavakat [URL: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces6boxshade.html>]. A SCO5461 fehérje legvalószínűségi

nűbb másodlagos szerkezetét az SSPRED program és TMpred server használatával jósoltuk meg [URL: <http://www.coot.embl.de/~fmilpetz/SSPRED> és URL: <http://ch.embnet.org>], a fehérje feltételezett 3D szerkezetét pedig a (PS)² automata homológia modellező szerver segítségével készítettük el [URL: <http://ps2.life.nctu.edu.tw>].

A SCO5461 fehérje N-terminális feltételezett szignál szekvenciáját a SignalP (3.0 verzió) programmal [URL: <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>] elemeztük, majd a TatFind 1.4 verzióját és a TatP 1.0 verzióját használtuk annak eldöntésére, vajon valódi Tat szignál szekvencia-e [URL: <http://www.signalfind.org> és URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP-1.0>].

Az ampifikációhoz felhasznált oligonukleotid primerek másodlagos szerkezetét és heterodimer képzését Oligoanalyzer 3.1 programmal [URL: <http://www.idtdna.com/analyzer>] ellenőriztük. A nem kívánt rekombinációs folyamatok elkerülése végett BlastN [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>] kereséssel győződünk meg arról, hogy a ReDirect technikában felhasznált primerek a St3D11 cosmidon csak egy helyet jelölnek ki.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A fehérjék mono-ADP-ribozilációját a mono-ADP-riboziltranszferáz (ADPRT) enzimek katalizálják, endogén ADPRT enzimeket kimutattak már pro-, és eukarióta sejtekben is. Az ADPRT katalizálta fehérje módosítást a mono-ADP-ribóz-fehérje glikohidroláz (MARH) enzimek teszik reverzibilissé.

Munkacsoportunk korábban már kimutatott ADP-ribozilált fehérjéket és arginin-specifikus ADPRT aktivitást *S. griseus*-ban, de hosszú ideig nem voltak pontos molekuláris ismereteink sem az ADP-ribozilált fehérjékről, sem a módosítást katalizáló enzimekről.

Ezért a fehérje mono-ADP-riboziláció sejtben betöltött funkciójának megértéséhez a *S. coelicolor*-ral folytatott jelen munkánk során célul tűztük ki, hogy azonosítsuk a sejtben endogén úton ADP-ribozilált fehérjéket; szekvencia homológia alapján próbáljunk meg azonosítani még ismeretlen ADPRT enzimet kódoló gént; továbbá az azonosított ADPRT enzimet kódoló gén megszakításával/antibiotikum rezisztencia kazettára történő kicserélésével létrehozott null mutáns fenotípusának vizsgálatával szerezzünk ismereteket az adott ADPRT enzim biológiai szerepéről.

4.1. ADP-ribozilált fehérjék azonosítása *Streptomyces coelicolor*-ból

Munkánk során először az ADP-ribozilációs reakció optimális feltételeit állítottuk be. Az *S. coelicolor* sejt kivonatához radioaktívan jelölt [³²P]-NAD⁺-ot adva szubsztrátként kimutattuk, hogy a fehérjékbe történő ADP-ribóz beépülés 30 percnél éri el maximumát, ezután csökken. Ennek a csökkenésnek az oka valószínűleg az, hogy a sejt kivonat NADGH aktivitása elbontja a NAD⁺-ot és a poszttranszlációs modifikációt reverzibilissé tevő MARH aktivitás pedig lehasítja a már beépült ADP-ribózt a fehérjékről [*S. coelicolor* genomjában legalább hat, az ismert MARH enzimekkel nagymértékű szekvencia homológiát mutató gén található (*SCO0086*, *SCO1766*, *SCO2028*, *SCO2030*, *SCO4435*, *SCO5809*; saját szekvencia analízis)]. Feleslegben adott, jelöletlen ADP-ribózt adva a reakcióhoz növelni tudtuk az ADP-ribóz fehérjékbe történő beépülését, ami valószínűleg a MARH aktivitás gátlásának a következménye (a NADGH-t nem gátolja az ADP-ribóz). A nagy fölöslegben lévő „hideg” ADP-ribóz csökkenti a reakcióelegyben jelenlévő, a radioaktív NAD⁺ bontásából származó [³²P]-ADP-ribóz nem enzimátikus úton fehérjékbe történő beépülését is, lehetővé téve azt, hogy valóban csak az ADPRT enzimek katalizálta fehérje ADP-ribozilációt mérjük a kísérletben.

A *S. coelicolor*-ban található ADP-ribozilált fehérjék izolálásához m-aminofenilboronsav affinitás kromatográfiát és 2D SDS-PAGE elektroforézist, azonosításához pedig a gélben tripszinnel való emésztést követő MALDI-TOF tömegspektrometriás peptid analízist használtunk. Nyolc fehérjét sikerült egyértelműen azonosítanunk a *S. coelicolor* ADP-ribozilált fehérjéi közül. Eredményeink azt mutatták, hogy néhány fehérje több, általában eltérő pI értékű foltban is kimutatható volt a 2D gélen. A több foltot is elfoglaló fehérjéket két csoportba lehet osztani. A SCO5477 esetében a fehérje várt molekulatömegének és pI-nak megfelelő pozíciójú fő folt mellett több izoforma is jelen volt, amelyeknek kis mértékben alacsonyabb az izoelektromos pontjuk a SCO5477 fehérjére jellemző értéktől. A SCO5477 esetében a több eltérő izoforma létrejöttét ADP-riboziláció – két negatívan töltött foszforsav maradék kapcsolódik a fehérjéhez – mellett az Asp és Gln spontán dezamidációja is eredményezheti. A második csoportba tartozó fehérjék két foltban voltak megtalálhatóak a 2D gélen. Mindkét fehérje esetében (SCO4771; SCO4824) az egyik izoforma móltömege és pI-ja a natív fehérjére jellemző értékek felel meg, míg a másik változat azonos molekulatömeggel, de alacsonyabb izoelektromos ponttal rendelkezik. A SCO4771 és a SCO4828 fehérje között az a hasonlóság, hogy multimerként látják el a funkciójukat a sejtben. Érdekes módon mindkettő esetében az eredeti, módosítás nélküli forma és az ADP-ribozilált forma is megtalálható a 2D gélen. A két forma együttes jelenlétének érdekes következménye lehet, hogy a multimer aktivitását a komplexet alkotó ADP-ribozilált és a módosítatlan alegységek közti arány befolyásolja. Az alkotóelemek egyedi módosítottságától való aktivitás-függés az enzim aktivitásnak egyfajta finom-hangolását teheti lehetővé, amellyel a működési egységet alkotó komplex a sejt anyagcseréjének pillanatnyi szükségletéhez tud igazodni. Hasonló regulációs mechanizmus figyelhető meg az *E. coli*-ban, ahol a glutamin szintetáz enzim tizenkét azonos alegységének egyenkénti adenililáltsági állapota szabályozza az enzim aktivitását.

A nyolc azonosított fehérjét három csoportba sorolhatjuk a feltételezett vagy ismert biológiai szerepük alapján, így megkülönböztethetünk (1) szekretált fehérjéket, (2) dehidrogenáz enzimeket és (3) egyéb fehérjéket. Az általunk talált négy ADP-ribozilálódó szekretált fehérje két biológiai funkció köré csoportosítható. A SCO2008 és a SCO5477 egy-egy ABC transzporter komplex extracelluláris ligand-kötő lipoprotein alegysége. Eredményünket megerősíti, hogy a SCO2008-at korábban cisztein oldalláncon ADP-ribozilált fehérjeként már kimutatta Sugawara és munkacsoportja is. A fehérje ADP-ribozilálódó ciszteinje azonos azzal a ciszteinnel, amely minden leendő lipoproteinben a transzlokációhoz szükséges szignálszekvenciában, annak lipobox részében található és amelynek szulfhidril

csoporthoz a lipoprotein diacilglicerol transzferáz egy lipid molekulát kapcsolva a membránhoz rögzíti az érett, a cisztein melletti hasítás miatt szignálpeptidet már nem tartalmazó lipoproteint. Sugawarának azt feltételezték, hogy a Cys oldallánc ADP-ribozilációja gátolja az éretlen fehérje szekrécióját és így a lipoprotein diacilglicerol transzferáz enzim nem kapcsolhat hozzá lipidet. Az ADP-riboziláció tehát egyrészt megakadályozná a fehérje kijutását a külső membránfélre, másrészt annak lipid molekulán keresztüli membránhoz rögzülését is gátolná, tehát a citoplazmában maradó ADP-ribozilált fehérje nem képes a transzportfolyamatokban ellátni a szerepét. A SCO5477 fehérjében is megtalálható egy, a SCO2008-éhoz hasonló, a megfelelő pozícióban ciszteint is tartalmazó szignálszekvencia, ezért Piette és munkatársai egy közleményükben azt feltételezték, hogy a SCO5477 is ADP-ribozilált protein. A tény, hogy mi ADP-ribozilált fehérjeként azonosítottuk a SCO5477-et alátámasztja ezt az elképzelést.

A másik két szekretált fehérje, a SCO6108 (FusH) és a SCO1968 hidroláz enzimek. A FusH a fuzidinsav antibiotikum elleni rezisztanciáért felelős észteráz. Mivel az ADP-ribozilált FusH-t is a citoplazma kivonatból izoláltuk, intracelluláris lokalizációja arra enged következtetni, hogy a fehérje ADP-ribozilációja befolyásolhatja az extracelluláris térbe irányuló transzportot. A SCO1968 egy feltételezett szekretált hidroláz, amely a *Bacillus subtilis* GlpQ proteinjével mutat homológiát. A GlpQ egy foszfát-éhezés által indukált glicerofosfolipid foszfodiészteráz, amely a zsírsavakat már nem tartalmazó, deacilált foszfolipideket glicerin-3-foszfáttá hidrolizálja. Miután az eddig megismert példák arra utalnak, hogy az ADP-riboziláció inaktiválja a módosított fehérjét, az enzim reverzibilis ADP-ribozilációja a sejt glicerín anyagcseréjét befolyásoló poszttranszlációs szabályozó mechanizmusok egyike lehet *S. coelicolor*-ban.

Az ADP-ribozilált fehérjék második, dehidrogenázokat tartalmazó csoportjába tartoznak a SCO4771 és SCO4824 gének kódolta fehérjék. Ezek esetében a MASCOT program segítségével sikerült azonosítanunk az ADP-ribozilált peptid fragmenteket is.

SCO4771 fehérje egy inozin-5'-monofoszfát dehidrogenáz enzim (IMPDH). Két, az IMPDH egyik erősen konzervált régiójából származó (207-225 és a 226-245), Arg tartalmú triptikus peptid fragment móltömege is a fehérje ADP-ribozilált formájára jellemző, kissé magasabb móltömegegre utalt. Lehetséges tehát, hogy az Arg-225 és az Arg-244 a két módosított aminosav, azaz az IMPDH két helyen is ADP-ribozilálódhat. Prokariótákban az intracelluláris GTP koncentráció döntő szerepet játszik a morfológiai differenciálódás szabályozásában. Az IMPDH az intracelluláris GTP-szinttől függő de-novo GTP bioszintézist

katalizálja, ezért az enzim ADP-ribozilációja a spóráképzés és az antibiotikum termelés fontos élettani szabályozó mechanizmusként működhet.

A dehidrogenázok csoportjának másik fehérjéje a *SCO4824* által kódolt FOLD, amely a tetrahydrofolát anyagcsere kettős funkciót ellátó enzime, metilén-tetrahydrofolát dehidrogenáz és metilén-tetrahydrofolát ciklohidroláz is egyben. Az enzim általunk ADP-riboziláltnak azonosított GAEEVVVGR peptid fragmentuma egy evolúciósan erősen konzervált NADP⁺-kötő motívum része. A FOLD ADP-ribozilációja és ezáltal inaktivációja a metionin és purin bioszintézist gátolva döntő fontosságú lehet az elsődleges anyagcsere folyamatok és a differenciálódás szabályozásában.

A harmadik csoportba két fehérje tartozik. Az egyik az éhezésre érzékenyítő *SCO7629* kódolta SpaA protein. A SpaA fehérje az *E. coli*-ban a stacionáris fázis szabályozásában szerepet játszó RspA fehérjével homológ. Korábban már kiderült, hogy a *SCO7629* gén megszakítása *Streptomyces*-ekben kondicionális, sejtsűrűségtől függő fenotípust eredményez. A mutáns tenyésztete nagy sejtsűrűség esetén minimál táptalajon később kezd antibiotikumot termelni, ugyanakkor nagyobb mennyiséget termel, mint a vad. A SpaA enzim endogén ADP-ribozilációja hatással lehet tehát a baktérium sejtsűrűsége adott válaszára. A másik ide tartozó fehérje a *SCO2198* kódolta glutamin szintetáz, a GlnA, amelynek aktivitását prokariótákban (főleg bélbaktériumokban) egy poszttranszlációs módosítás, az adenililáció szabályozza. *S. coelicolor*-ban is kimutatták a fehérje konzervált Tyr-397 oldalláncának adenililálódását. Fontos megjegyeznünk, hogy munkacsoportunk korábban *S. griseus*-ban már kimutatta a GlnA *in vitro* ADP-ribozilációját ami inaktiválta a glutamin szintetázt. *Rhodospirillum rubrum*-ban és később *Synechocystis* fajokban is leírták ezt a módosítást. A mostani eredményünk tehát ismét megerősíti azt a megfigyelésünket, hogy *Streptomyces*-ekben a GlnA ADP-ribozilálódhat.

Az általunk azonosított nyolc fehérjéből hat újonnan azonosított ADPRT célfehérje. Kettő esetében korábbi eredményeket sikerült megerősítenünk. A glutamin szintetázról *S. griseus*-ban már korábban kimutatták, hogy ADP-ribozilált fehérje és a mostani eredményeink szerint *S. coelicolor*-ban is ADP-ribozilálódik. A Piette-ék által ADP-ribozilált fehérjének feltételezett *SCO5477* esetében pedig mi mutattuk ki, hogy ez a fehérje valóban ADP-ribozilált. Fontos eredménynek tartjuk, hogy találtunk négy olyan fehérjét (a *SCO5477*-t, az IMPDH-t, a SpaA-t és a FOLD-t), amelyek konkrét például szolgálnak a fehérjék ADP-ribozilációja és a morfológiai differenciálódás között korábban általunk feltételezett kapcsolatra.

4.2. A *SCO5461*, feltehetően ADPRT enzimet kódoló gén azonosítása és feltételezett fehérjetermékének bioinformatikai elemzése

Mivel célkitűzésünk volt egy ADPRT enzim génjében mutáns törzs elkészítése azonosítanunk kellett ADPRT enzimeket kódoló géneket. Először bioinformatikai módszerekkel próbáltunk olyan géneket azonosítani a *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomjában, amelyek ADPRT enzimeket kódolhatnak. Mivel az ADPRT-ra jellemző nagyfokú szekvenciabeli plaszticitás megnehezíti a homológok *in silico* azonosítását, ezért pozíció-érzékeny PSI-BLAST programot használtunk a szekvencia analízishez. A már ismert ADPRT fehérjék teljes aminosav szekvenciájának összehasonlítása csak kismértékű azonosságot mutat, de a NAD⁺ kötőhely és a katalitikus aktív centrum kialakításához szükséges három erősen konzervált szekvencia motívum segíthet az ADPRT enzimek azonosításában. A szekvencia analízis eredményeként két, feltételezhetően ADPRT-t kódoló gént találtunk a *S. coelicolor* genomjában, a már említett *SCO2860*- és a *SCO5461* géneket. A három motívumra szűkített összehasonlítás alapján az ismert aminosav szekvenciájú ADPRT-okat tekintve a *Streptomyces* törzseken kívül a lepkékben előforduló, emlős sejtekre citotoxikus, DNS-t ADP-riboziláló pierisin-1 és -2, a *Bacillus sphaericus* termelte, Arg specifikus MTX és a *Vibrio cholerae* Arg specifikus kolera toxinjának katalitikus alegysége, a CT-A bizonyultak a *SCO5461* legközelebbi homológjának.

A *SCO5461* fehérje megjósolt másodlagos szerkezetét és a CT-A ismert 3-D szerkezetét alapul véve a *SCO5461* fehérje szerkezeti modellje is megalkotható volt. A kolera toxin szerkezetéhez hasonlóan a *SCO5461* fehérjében is két β -lemezen található az első két konzervált motívum, és egy hurokszerű struktúrára tehető a harmadik motívum. Ebben a harmadik motívumban, a katalitikus E aminosavat is tartalmazó ún. ARTT hurokban található Q/EXE motívumban van egy fontosnak tűnő eltérés a *SCO5461* és a homológjai között. Az MTX-ben és a CT-A-ban is, akárcsak a többi arginin specifikus toxinban jellemezően EXE, a *SCO5461*-ben QXE ez a motívum. Ilyen szekvencia motívum található a DNS-t módosító pierisinekben, az aszparagin specifikus *Clostridium botulinum* C3 exoenzimjében és a cisztein oldalláncot ADP-riboziláló pertussis toxinban is. A kolera toxint is magába foglaló arginin specifikus ADPRT-oknál a motívumban az erősen konzervált katalitikus glutaminsav előtti glutaminsav (EXE) esszenciális a szubsztrát kötéséhez. Mivel aszparagint és ciszteint ADP-riboziláló toxinoknál, sőt DNS-t ADP-riboziláló enzimmél is QXE motívumot találunk, ezért a Q ezen a motívumon belül nem alkalmas a *SCO5461* a szubsztrát specifikitásának meghatározásához.

Az ismert genomiális szekvenciájú *Streptomyces* törzseket figyelembe véve *SCO5461* orthológjai a törzsfán távolabb található törzsekben, pl. a *S. griseus*-ban nincsenek jelen, csak a törzsfán egymáshoz közelebb eső *Streptomyces* törzsekben. A *Streptomyces* törzsek közül a *S. coelicolor*-ral közeli rokonságot mutató törzsekben található hipotetikus fehérjék (*S. lividans* TK24, SSPG_02248.1; *S. albus* J1074, SSHG_04549.3; *S. scabies*, SCAB27771; *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, SSDG_06196.1) és a *Streptomyces*-ekkel közeli rokonságban lévő *Streptosporangium roseum* DSM 4321 törzsből lévő hipotetikus fehérje (YP_003344216.1) mutatkoztak a *SCO5461* legközelebbi homológjainak. Lehetséges, hogy a rokon törzsek közös őse horizontális géntranszfer révén kaphatta a bakteriális toxinokkal hasonlóságot mutató fehérjeterméket kódoló szekvenciát.

A *SCO5461* fehérjében a szignálszekvenciákat azonosító SignalP program felismert egy N terminális, három részből álló szignál szekvenciát, amely bár hasonlít az iker-arginin transzlokációs (Tat) szignálhoz, a Tat szignálok azonosítására specializált programok – a TatFind és a TatP – egyike sem találta ezt a szekvenciát valódi Tat szignálnak. Ezt az állítást Widdick és munkatársai kísérletesen is bizonyították, a *SCO5461* szignálszekvenciája alkalmatlan volt egy riporter fehérje extracelluláris térbe történő szekrécijára. A gén szignálszekvenciája a Sec szekréciónál utólagos szignálpeptidjével is mutat hasonlóságot, de a *SCO5461* szignálszekvencia C régiójának legvégén lévő pozitív töltésű lizin (K41) oldallánc Sec elkerülő szignálként funkcionál. Ezekből az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy a *SCO5461* nem szekretált fehérje. Ezzel összhangban a TMpred és SSPRED szoftverrel készített másodlagos szerkezeti modellek azt mutatják, hogy a *SCO5461* egy három doménnel rendelkező transzmembrán fehérjét kódol. Tartalmaz egy rövid N terminális intracelluláris domént, egy helikális transzmembrán domént és egy nagyobb extracelluláris katalitikus domént. Azaz a *SCO5461* valószínűleg egy periplazmatikus, membránhoz kötött enzim.

4.3. Az *S. coelicolor* M145 Δ *SCO5461::apr* null mutáns elkészítése és komplementálása

Kísérleteink utolsó fázisában a *S. coelicolor* genomban a *SCO5461* gént a ReDirect technikával egy apramycin rezisztenciáért felelős gént tartalmazó génhelyettesítő kazettára cserélve létrehoztuk a *S. coelicolor* Δ *SCO5461::apr* mutánst.

A teljes, genomiális *SCO5461* gént plazmidon (pWHE1) bejuttatva komplementáltuk a mutáns törzset. Ehhez a gént *in frame* klónoztuk a pWHM3 plazmidon elhelyezkedő gyenge lacZ promotor mögé, így a *S. coelicolor* Δ *SCO5461::apr/pWH1* komplementált mutáns

törzsben a SCO5461 fehérje termelődött, de nem expresszáldott nagymértékben. A komplementált mutáns szemmel és mikroszkóppal megvizsgálva is minden táptalajon azonos fenotípust mutatott, mint az M145 vad típusú törzs. Az ADP-ribozilációs mintázata is a vad típusú törzsével vált megegyezővé. Mindez azt bizonyítja, hogy a null mutáns vadtól eltérő fenotípusos jellegeiért a SCO5461 fehérje hiánya, azaz a szubsztrát(ok) mono-ADP-ribozilációjának elmaradása tehető felelőssé.

4.4. A mutáns fenotípusának elemzése

Morfológiai differenciálódás

Mivel közismert, hogy egyes, a morfológiai differenciálódásban érintett mutánsok fenotípusát befolyásolják a tenyésztési körülmények, ezért négy különböző szilárd táptalajon – SFM, SMMS, SMMS+10% szacharóz (SMMS+) és R5 – tenyésztettük a *S. coelicolor* M145 vad fenotípusú törzset és a *S. coelicolor* Δ SCO5461::apr mutáns törzset és vizsgáltuk a tenyészetek morfológiai differenciálódását. A gazdag, szójaliszt tartalmú SFM táptalajon nem találtunk fenotípusos különbséget a törzsek között. SMMS minimál táptalajon a mutáns megkésett morfológiai differenciálódást mutatott a vadhoz képest, 48 órás korú tenyészetében légmicélium mentes, *bald* mutánsokra emlékeztető volt mutáns telepek felszíne. A 120 órás tenyészetben már képződött légmicélium és a mutáns végeredményben spórázott is, de nem képzett olyan tömegű spórát, mint ami a vad fenotípusra jellemző. Az ozmotikus stresszt okozó SMMS+ táptalajon ugyanezek a tulajdonságok jellemezték a mutáns tenyészetet, de még későbbre tolódott ki a differenciálódás kezdete (7.-8. napra). A tápanyagokban gazdag, szintén ozmotikus stresszt okozó R5 táptalajon egyedül növesztett mutáns nem spórázott. Telepeinek felületén még 12 napos korban is csak szórványos légmicélium képzést figyeltünk meg. Nem a klasszikus értelemben vett *bald* fenotípus volt jellemző a mutánsra, hiszen a telep szélén képződött kevés légmicélium és antibiotikumot is termelt. A mutáns differenciálódása extracellulárisan komplementálhatónak bizonyult, mivel R5 táptalajon a vad törzssel együtt növesztett mutáns megkésve bár, de sporulált. Valószínűleg a vele együtt fejlődő vad törzs tenyészetéből származó diffúzibilis kis molekulák kerültek kapcsolatba a mutáns sejtekkel (feltehetően rodlinok, chaplinok) és elősegítették azoknak a differenciálódását. Ha a vad törzs által előzőleg már használt táptalajra oltottuk a mutáns tenyészetet, akkor is megfigyelhető volt a mutáns spóra képzése R5 táptalajon. Ez a jelenség arra utal, hogy a SCO5461 gén megszakítása hatással lehet a légmicélium képzéshez szükséges diffúzibilis faktorok közül egy vagy több termelésére vagy szekréciójára.

A Petri csészékben növekvő tenyészeteken szabad szemmel megfigyelhető fenotípusos változásokat mikroszkóposan is nyomon követtük a táptalajokba szűrt fedőlemezekre növesztett tenyészeteken. Fáziskontraszt mikroszkóppal az 5 napos tenyészeteket vizsgálva láthatóvá vált, hogy SMMS táptalajon a vad törzs mintáiban már megjelent a csavarodó légmicélium és a szabályos spóraláncok, míg a mutáns esetében a nagy tömegű vegetatív micéliumban ritkábban fordult elő légmicélium és emellett szabálytalan alakú spóraláncok és sok, a mintakészítés során levált spóra is megfigyelhető volt. Összességében kevesebb spóra jellemezte a mutánst, mint a vadat. A vad és mutáns közötti különbség még kifejezettebbé vált az SMMS+ táptalajon, ahol a vadra jellemző hosszú, egyenes spóraláncokhoz hasonlóak a mutáns mintájában is voltak, azonban a mutáns spóráinak mérete sok esetben jelentősen eltért egymástól, sőt gyakran előfordult az is, hogy a spórák és hifa csúcsok erősen megduzzadtak. Mindez arra utalhat, hogy a mutáns spórák kereszt- és sejtfala különbözhet a vadétól, azaz a normális sejtfalszintézishez és a differenciálódás normális lezajlásához valószínűleg szükség van a SCO5461 aktivitására, különösen ozmotikus stressz esetén. Az R5-ön normális differenciálódást mutató vad törzshöz képest az elszigetelten növesztett mutáns mintáiban még 12 napos korban is csak jelentéktelen mennyiségben volt megfigyelhető légmicélium vagy spóra.

Az említett három táptalajon, szintén fedőlemezekre növesztett vad és mutáns tenyészetek DNS tartalmát propídium-jodiddal festettük meg. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal nem találtunk különbséget a különböző táptalajokon nőtt törzsek micéliumában és spóráiban a DNS elhelyezkedésében.

Antibiotikum termelés és szekréció

A mutáns antibiotikum termelését szilárd és folyékony táptalajokon is vizsgáltuk. A szilárd táptalaj felszínére helyezett steril szűrőkre oltottuk rá a törzsek spóráit. Ez megakadályozza azt, hogy a micélium belenőjön a táptalajba, ezért ha a koronggal együtt a tenyészetet is eltávolítjuk a táptalaj felszínéről, akkor lehetővé válik a tisztán az extracelluláris térbe kiválasztott actinorhodin vizsgálata. A vad és a mutáns törzsek között a tápanyagban gazdag R5 táptalajon tapasztaltuk a leglátványosabb különbséget, mivel 7 naposan a mutáns már jelentősen több antibiotikumot termelt és szekretált a vadnál. Minimál táptalajokon (SMMS és SMMS+) növesztett tenyészeteknél az R5-ön megfigyelthez képest ellentétes tendenciát figyeltünk meg, mivel a vad törzshöz képest a mutáns kevesebb actinorhodint termelt. Főleg az SMMS táptalajon csökkent le erősen a termelt antibiotikum mennyisége, és a mutáns nem is szekretálta azt a táptalajba. Az ozmotikus stresszt okozó SMMS+ táptalajon

nem látszott ilyen jelentős különbség a vad és a mutáns antibiotikum termelése és szekréciója között, csak a tenyészetek eltérő színe jelentett különbséget, ami az intra- és extracelluláris pH értékek közötti különbségre utal. A mutáns táptalajoktól függő, eltérő viselkedésére magyarázatul szolgálhat talán az a feltételezés, hogy a SCO5461 fehérje hiánya miatt a differenciálódás lelassulása mutánsban befolyásolja a szekunder metabolit termelést is, késleltetheti, illetve csökkentheti azt. A jó tápanyag ellátottság ozmotikus stresszel kombinálva viszont a spóra képzés elmaradása mellett az antibiotikum túltermelését és erőteljesebb szekrécióját váltja ki.

A törzsek által termelt extracelluláris γ -actinorhodin pontos mennyiségének meghatározásához folyékony SFM táptalajon tenyésztettük a vad- és mutáns törzset. Bár a két tenyészet micéliumának kék színe azt jelezte, hogy az actinorhodin termelése normális módon zajlik mindkét törzsben, a mutáns tenyészet sejtjei egyáltalán nem választották ki az extracelluláris térbe az antibiotikumot. A szilárd és folyékony táptalajon tapasztalt eltérés arra utal, hogy az antibiotikum szekréció szabályozása különböző lehet a folyékony és szilárd táptalajon növesztett kultúrákban. Még tisztázatlan, hogy a SCO5461 által katalizált ADP-riboziláció hogyan képes hatni az actinorhodin transzportjára. A *S. coelicolor* M145-ből általunk izolált és MALDI-TOF analízissel azonosított ADP-ribozilált fehérjék között nem találtunk olyat, amelyet egyértelműen kapcsolatba lehetne hozni az antibiotikum szekréció mechanizmusával.

4.5. A SCO5461 fehérje ADPRT aktivitásának igazolása

A Δ SCO5461::*apr* mutáns-, a vad- és a komplementált törzs ADP-ribozilált fehérjéi mintázatának összehasonlítása igazolta, hogy a SCO5461 gén valóban egy ADP-riboziltranszferáz enzimet kódol, mivel a mutáns mintájából a ~65 kDa méretű ADP-ribozilált fehérje hiányzott, ugyanez a fehérje viszont ADP-ribozilálódott a komplementált mutáns és a vad típusú M145 törzs mintájában. MALDI-TOF analízissel ADP-ribozilált fehérjeként azonosítottunk egy 65,3 kDa molekulatömegű fehérjét, a SCO5477 gén kódolta ligand-kötő ABC-transzporter alegységet, amely elképzelhető, hogy azonos a hiányzó ADP-ribozilált fehérjével. A vad fenotípusú törzsek és a mutáns mintáit egybevetve az ADP-ribozilált fehérje mintázat nem mutatott drámai különbséget, ami azzal magyarázható, hogy a SCO2860 és a SCO5461 gének termékei mellett még több ADPRT enzimaktivitású fehérje is jelen lehet a *S. coelicolor*-ban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérjék-mono-ADP-ribozilációja egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás, amelyet a mono-ADP-riboziltransferáz (ADPRT) enzimek katalizálnak. Kísérleteink során a bonyolult morfológiai és differenciálódási folyamattal rendelkező és antibiotikumot termelő *Streptomyces coelicolor* A3(2) baktérium törzsben található ADP-ribozilált fehérjéket kívántuk izolálni és azonosítani. Célunk volt továbbá az eddig nem ismert ADPRT enzimek génjeinek szekvencia homológiák alapján történő azonosítása és egy ADPRT génre nézve null mutáns *S. coelicolor* törzs előállítás. A mutáns fenotípusának elemzésével és az endogén úton ADP-ribozilált fehérjék megismerésével a fehérje mono-ADP-riboziláció *S. coelicolor*-ban betöltött biológiai funkcióját akartuk megismerni.

Elsőként a vad típusú *S. coelicolor* tenyészetből készített nyers citoplazmakivonatban *in vitro* ADP-riboziláltuk a fehérjéket. Az optimális reakció körülmények azonosítását követően m-aminofenilboronsav affinitáskromatográfiás eljárással tisztítottuk és 2-D SDS-PAGE gélen választottuk szét az ADP-ribozilált fehérjéket. A gélben történő tripszines emésztésből származó fragmentek MALDI-TOF tömegspektrometriás analízisével azonosítottunk nyolc ADP-ribozilált fehérjét: SCO5477, SCO2198, SCO2008, SCO4771, SCO1968, SCO4824, SCO6108, SCO7629. Hat fehérjét mi azonosítottunk először ADP-ribozilált fehérjeként, kettő esetében pedig megerősítettünk korábbi irodalmi eredményeket.

A *S. coelicolor* genom *in silico* vizsgálatával azonosítottunk egy feltételezhetően ADPRT-t kódoló gént, a SCO5461-et. A SCO5461 gént egy apramycin rezisztenciáért felelős kazettával helyettesítettük a genomban, az így létrejött null mutáns (*S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::apr) kondicionális pleiotróp fenotípust mutatott. Táptalajtól függő módon normális vagy megkésett differenciálódást mutatott vagy nem is sporulált. A genomiális gén plazmidon való bejuttatásával komplementáltuk a mutánst (Δ SCO5461::apr/pWH1), a vad allél visszaállította a mutáns fenotípust a vad törzsre jellemzőre. A *S. coelicolor* M145 vad törzs, a null mutáns és komplementált mutáns törzsek ADP-ribozilált fehérje mintázatának összehasonlítása azt mutatta, hogy a mutáns törzs mintájából hiányzik egy ~65 kDa méretű ADP-ribozilált fehérje. A komplementált törzs mintájában újra megtalálható volt ez a fehérje. Kimutattuk, hogy folyékony és szilárd táptalajokon a mutáns termelte actinorhodin mennyisége és az antibiotikum szekréciónak mértéke eltért a vad törzsetől. Mindezekből arra következtettünk, hogy a SCO5461 ADPRT enzim fontos szerepet játszik a *S. coelicolor* morfológiai differenciálódásában és az antibiotikum termelésében és szekréciónak.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. A Ph.D. értekezés alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/349/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Szirák Krisztina

Neptun kód: LN1JSL

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szirák, K.**, Keserű, J., Biró, S., Schmelczler, I., Barabás, G., Penyige, A.: Disruption of SCO5461 gene coding for a mono-ADP-ribosyltransferase enzyme produces a conditional pleiotropic phenotype affecting morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*.
J. Microbiol. 50 (3), 409-418, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-1440-y>
IF:1.095 (2011)
2. Penyige, A., Keserű, J., Fazakas, F., Schmelczler, I., **Szirák, K.**, Barabás, G., Biró, S.: Analysis and identification of ADP-ribosylated proteins of *Streptomyces coelicolor* M145.
J. Microbiol. 47 (5), 549-556, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-009-0032-y>
IF:1.463



6.2. Egyéb saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

További Közlemények

3. Kashuba, E., Yurchenko, M., **Szirák, K.**, Stahl, J., Klein, G., Székely, L.: Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 binds to Epstein-Barr virus-induced Fte1/S3a protein.
Exp. Cell Res. 303 (1), 47-55, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.025>
IF:4.148
4. Zeke, T., Kókai, E., Szőőr, B., Yatzkan, E., Yarden, O., **Szirák, K.**, Fehér, Z., Bagossi, P., Gergely, P., Dombrádi, V.: Expression of protein phosphatase 1 during the asexual development of *Neurospora crassa*.
Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 134 (1), 161-170, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00188-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00188-4)
IF:1.579
5. Fehér, Z., **Szirák, K.**: Signal transduction in fungi: The role of protein phosphorylation.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46 (2-3), 269-271, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.46.1999.2-3.17>

Összesített impakt faktor: **8.285**

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): **2.558**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.11.20



6.3. Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

Szentesiné Szirák Krisztina, Keserű Judit, Schmelczer Iván, Barabás György, Biró Sándor, Penyige András (2011) Egy mono-ADP-riboziltranszferáz mutáns *Streptomyces coelicolor*. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok (poszter).

Penyige András, **Szentesiné Szirák Krisztina**, Keserű Judit, Schmelczer Iván, Biró Sándor (2012) Analysis of the physiological role of protein ADP-ribosylation in *Streptomyces coelicolor*. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. (előadás)

6.4. Egyéb előadások, poszterek

Fehér Zsigmond, Szöőr Balázs, Zeke Tamás, Vissi Emese, Yarden, Oded, Yatzkan, Einat, **Szirák Krisztina**, Gergely Pál, Dombrádi Viktor (1999) Egy új típusú Ser/Thr protein foszfatáz génjének klónozása *Neurospora crassa*-ból. Magyar Genetikusok Egyesülete 4. Konferenciája, Siófok. (poszter)

Zeke Tamás, Fehér Zsigmond, Szöőr Balázs, Kókai Endre, Yarden, Oded, Yatzkan, Einat, **Szirák Krisztina**, Csóka Balázs, Gergely Pál, Dombrádi Viktor (2000) A gene encoding a type 1 protein phosphatase from *Neurospora crassa*. ECGF 5., Arcachon, Franciaország. (poszter)

Szirák Krisztina, Zeke Tamás, Csóka Balázs, Szöőr Balázs, Ács Sándor, Gergely Pál, Dombrádi Viktor, Fehér Zsigmond (2000) Protein foszfatázok biológiai szerepének vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel *Neurospora crassa*-ban. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 5. munkaértekezlete, Sopron.(poszter)

Szirák Krisztina, Zeke Tamás, Lontay Beáta, Grósz Gábor, Dombrádi Viktor, Fehér Zsigmond (2001) Identification of proteins interacting with Ser/Thr phosphatases of *Neurospora crassa* using the yeast two-hybrid system. XXth International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology. Prága, Csehország (poszter)

Yeast 18(S1) S168, (2001)

IF: 2,54

Szirák Krisztina, Csóka Balázs, Zeke Tamás, Grósz Gábor, Sztanek Ferenc, Dombrádi Viktor, Fehér Zsigmond (2002) A genomics approach for the identification of regulatory subunits of protein phosphatase 1 in *Neurospora crassa*. 2. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged (poszter)

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 49, 406-407.

IF: 0,195

Szirák Krisztina, Sztanek Ferenc, Dombrádi Viktor, Doonan, John H., Fehér Zsigmond (2003) Két *Neurospora crassa* Ser/Thr foszfatáz biológiai funkciójának tanulmányozása. Magyar Genetikusok Egyesülete 5. Konferenciája, Siófok. (poszter)

Grósz Gábor, **Szirák Krisztina**, Doonan, John H., Fehér Zsigmond (2004) Két *Neurospora crassa* protein-foszfatáz gén expressziójának vizsgálata *Aspergillus*ban. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának IX. Munkaértekezlete, Sopron. (poszter)

Grósz Gábor, **Szirák Krisztina**, Doonan, John H., Fehér Zsigmond (2004) Heterologous expression of *Neurospora* protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans*. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és X. Fermentációs Kollokvium, Keszthely. (poszter)

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (2004)

IF: 0,195

Grósz Gábor, Liliom Károly, Baksa Attila, **Szirák Krisztina**, Takács László és Fehér Zsigmond (2006) Humán lipid-kinázok expressziója intracelluláris Ca²⁺ felszabadulást vált ki élesztő-sejtben. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, Pécs. (poszter)