

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**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

1. TARTALOM

1. TARTALOM	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. BEVEZETÉS	8
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
4.1. A <i>Streptomyces</i> nemzetség és a <i>S. coelicolor</i> A3(2)	10
4.1.1. A <i>S. coelicolor</i> A3(2) életciklusa és a morfológiai differenciálódás génszintű szabályozása	11
4.1.2. A <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) antibiotikumai és termelődésük szabályozása	14
4.1.2.1. Az actinorhodin termelése és transzportja	15
4.1.3. Fehérjék szekréciója <i>Streptomyces coelicolor</i> -ban	16
4.2. Az ADP-riboziláció és az ADP-riboziltranszferázok	18
4.2.1. A fehérje mono-ADP-riboziláció, mint reverzibilis posztranszlációs módosítás	20
4.2.2. A bakteriális toxinok	21
4.2.3. Az ADPRT enzimek konzervált szekvencia motívumai	23
4.2.4. Az MTX és a pierisin-1,-2	25
4.2.5. Mono-ADP-riboziláció a <i>Streptomyces</i> -ekben	27
4.2.5.1. Mono-ADP-riboziláció <i>Streptomyces coelicolor</i> -ban	28
4.2.5.2. A rifampicint ADP-riboziláló (Arr) enzimek	29
5. CÉLKITŰZÉSEK	31
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
6.1. Anyagok	32
6.1.1. Vegyszerek	32
6.1.2. Pufferek, oldatok	32
6.1.3. Baktérium törzsek	34
6.1.4. Táptalajok, tápoldatok	35
6.1.5. Vektorok	37
6.1.6. Oligonukleotid primerek	37
6.2. Módszerek	38
6.2.1. Tenyésztési körülmények	38
6.2.2. ADP-ribozilált fehérjék vizsgálata	39

6.2.2.1. Sejtkivonat készítése	39
6.2.2.2. ADP-ribozilációs reakciók	40
6.2.2.3. ADP-ribozilált fehérjék tisztítása m-aminofenilboronsav-agaróz affinitás kromatográfiás módszerrel	41
6.2.2.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	42
6.2.2.5. A radioaktív fehérjék blottolása és radiogramm készítése	42
6.2.2.6. Fehérjék szeparálása 2-D-gélen	43
6.2.2.7. A fehérjefoltok tömegspektrometriás analízise	45
6.2.2.8. A módosító csoport azonosítása HPLC-s módszerrel	46
6.2.3. A <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO5461:: <i>apr</i> null mutáns létrehozása ReDirect technikával	46
6.2.3.1. A génspecifikus kazetta elkészítése PCR-rel	48
6.2.3.2. <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 transzformálása az St3D11 cosmiddal	50
6.2.3.3. A <i>S. coelicolor</i> St3D11 cosmidot tartalmazó <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 transzformálása az PCR-rel amplifikált kazettával	51
6.2.3.4. St3D11:: <i>apr</i> mutáns cosmid DNS izolálása és ellenőrzése	51
6.2.3.5. A nem metiláló <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 transzformálása, majd <i>S. coelicolor</i> M145 konjugálása a transzformánsokkal	53
6.2.3.6. Az exkonjugánsok szelektálása és DNS-ük ellenőrzése	54
6.2.4. Az <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO5461:: <i>apr</i> törzs komplementálása	55
6.2.5. Mikroszkópos módszerek	58
6.2.5.1. Sztereomikroszkópos fotózás	58
6.2.5.2. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat	59
6.2.5.3. A <i>Streptomyces</i> minták DNS tartalmának vizsgálata konfokális mikroszkóppal	59
6.2.6. A törzsek antibiotikum termelésének és szekréciójának vizsgálata	60
6.3. Bioinformatikai elemzések	61
7. EREDMÉNYEK	62
7.1. ADP-ribozilált fehérjék azonosítása <i>Streptomyces coelicolor</i> -ból	62
7.1.1. A módosító csoport azonosítása HPLC-s módszerrel	68
7.2. ADPRT enzimet kódoló gén azonosítása a <i>S. coelicolor</i> -ban	69
7.2.1. A SCO5461 gén és ortológjai a megszekvenált <i>Streptomyces</i> fajok genomjában	69
7.2.2. A SCO5461 gén feltételezett fehérje termékének homológjai	73
7.2.3. A SCO5461 fehérje szerkezete <i>in silico</i> adatok alapján	74

7.2.3.1. Az mono-ADP-ribosziltranszferáz enzimekre jellemző konzervált motívumok a SCO5461 fehérjében	74
7.2.3.2. A SCO5461 protein feltételezhető szekunder és terciér szerkezete	75
7.2.3.3. Az N-terminális szignálszekvencia	77
7.3. A <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO5461:: <i>apr</i> null mutáns elkészítése	78
7.4. A <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO5461:: <i>apr</i> null mutáns komplementálása	80
7.5. A <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO5461:: <i>apr</i> null mutáns fenotípusának analízise	81
7.5.1. Morfológiai differenciálódás	81
7.5.2. Antibiotikum termelés és szekréció	86
7.5.3. ADP-riboszilált fehérje-mintázat	88
8. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	90
8.1. Az <i>in vitro</i> ADP-riboszilációs reakció optimális feltételeinek beállítása	91
8.2. A vad típusú törzs ADP-riboszilált fehérjéinek izolálása és azonosítása	91
8.3. ADPRT enzimet kódoló gén azonosítása szekvenciahomológiák alapján és a szekvencia <i>in silico</i> elemzése	94
8.4. Az általunk azonosított ADPRT gén eliminálása a <i>S. coelicolor</i> genomból	96
8.5. A létrehozott null mutáns fenotípusának elemzése	96
8.6. A null mutáns törzs komplementálása	99
8.7. A SCO5461 fehérje ADPRT aktivitásának bizonyítása	99
8.8. Eredményeink rövid összefoglalása	100
9. ÖSSZEFOGLALÁS	101
10. SUMMARY	102
11. FELHASZNÁLT IRODALOM	103
12. TÁRGYSZAVAK	114
13. KEYWORDS	115
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	116
15. FÜGGELÉK	118
15.1. A Ph.D. értekezés alapjául szolgáló közlemények	118
15.2. Egyéb saját közlemények	119
15.3. Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek	120
15.4. Egyéb előadások, poszterek	120
15.5. Tudománymetriai adatok	121

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-D SDS-PAGE – két-dimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis

2'-OH – a második szénatomhoz kapcsolódó hidroxil csoport

3-D – három dimenziós

aba – 3-aminobenzamid

ABC (ATP binding cassette) – ATP-kötő kazetta az ABC transzporter fehérjékben

APBA – m-aminofenilboronsav

apra – apramycin rezisztencia gén

BSA (bovine serum albumin) – szarvasmarha szérum albumin

bp – bázispár

ADP – adenzin-difoszfát

ATP – adenzin-trifoszfát

ADPRT – mono-ADP-riboziltranszferáz

APS – ammónium-perszulfát

ARTD – diftéria toxinhoz hasonló ADP-riboziltranszferáz

ARTT (ADP-ribosylating-turn-turn loop) – ADP-riboziláló hurok

ARR – rifampicin ADP- riboziltranszferáz

CBB – Coomassie Brilliant Blue

CHAPS – 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammónio]-1-propánszulfonát

CLSM (confocal laser scanning microscope) – konfokális lézer pásztázó mikroszkóp

CT – kolera toxin

CT-A – a kolera toxin katalitikus alegysége

Da – dalton

dH₂O – desztillált víz

DT – diftéria toxin

DTT – ditio-treitol, IUPAC név (2S, 3S)-1,4-dimerkaptobután-2,3-diol

DMSO – dimetil-sulfoxid

DRAG – dinitrogenáz reduktáz ADP-ribozilarginin glikohidroláz

DRAT – dinitrogenáz reduktáz ADP-riboziltranszferáz

ECF (extracytoplasmic function) – citoplazmán kívüli működés

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

eEF-2 – elongációs faktor 2

EGF (epidermal growth factor) – epidermális növekedési faktor

GTP – guanozin-trifoszfát

HEPES – 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etánszulfonsav, pufferanyag

HPLC (high pressure liquide chromatography) – magas nyomású folyadék kromatográfia

IEF – izoelektromos fókuszálás

IPG – immobilizált pH gradiens

IPTG – izopropil- β -D-tio-galaktopiranozid

KAc – kálium-acetát

kbp – kilobázispár

kDa – kilodalton

M145 – *Streptomyces coelicolor* M145 vad típusú törzs

MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization–time of flight) — mátrixhoz kötött lézer ionizációs „repülési idő” tömegspektrometriás eljárás

MARH – mono-ADP-ribóz-protein glikohidroláz

MARH-1 – mono-ADP-ribóz-arginin-hidroláz-1

Mbp – megabázispár

MOPS – 3-(N-morfolino)propánszulfonsav, pufferanyag

MTX – mosquitocidal toxin

MW (molecular weight) – molekula tömeg

NAD⁺ – nikotinamid-adenozin-dinukleotid

NADP⁺ – nikotinamid-adenozin-dinukleotid-foszfát

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OD (optical density) – optikai denzitás

ORF (open reading frame) – nyitott leolvasási keret

ori-T (origin of transfer) – a konjugációval való átjutás, transzfer kezdőpontja a DNS-en

PARP – poly(ADP-ribóz) polimeráz

PBS – foszfáttal pufferolt sóoldat

PCR (polymerase chain reaction) – polimeráz láncreakció

pI – a fehérje izoelektromos pontja

PSI-BLAST – position-specific iterative basic local alignment search tool

PT – pertussis toxin

RBL – ricin B típusú lektin

ReDirect (Rapid Efficient Directed Recombination Time saving) – homológ rekombinációkon alapuló génkicserélési technika

rpm – percenkénti fordulatszám

SapB (spore associated peptide B) – a víz felületi feszültségének csökkentéséhez vezető bevonat alkotórésze a *Streptomyces* légmicéliumon

SDS (sodium dodecyl sulphate) – nátrium-dodecil-szulfát

SFM (mannitol soya flour medium) – *Streptomyces* tenyésztéséhez használt tápanyagban gazdag táptalaj

SMMS (supplemented minimal medium, solid) – *Streptomyces* tenyésztéséhez használt minimál táptalaj

SMMS+ – SMMS táptalaj + 10% szacharóz

SOB (Super Optimal Broth) – *E. coli* tenyésztéséhez használt táptalaj

SOC (Super Optimal broth with Catabolite) – SOB + 20 mM glükóz

Tat – (twin-arginine translocase) szekréciós útvonal

TCA – triklór-ecetsav

TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin

TES – N-[trisz(hidroximetil)metil]-2-aminoetánsulfonsav, pufferanyag

Tris – trisz- (hidroximetil)-amino-metán, IUPAC név 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol

X – bármely aminosav

X-gal – 5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranozid

Δ SCO5461::*apr* – A SCO5461 génben mutáns *Streptomyces coelicolor* törzs, amelynek genomjában a SCO5461 gént egy apramycin rezisztenciáért felelős gént hordozó kazetta helyettesíti

λ RED – a λ fág saját rekombinációs rendszere

3. BEVEZETÉS

A *Streptomyces*-ek Gram-pozitív, obligát aerob, fonalas, bonyolult morfológiai és fiziológiai differenciálódási folyamattal rendelkező, szaprofita, talajlakó prokarióták. Morfológiájuk a szintén talajlakó és szaprofita penészgombákra emlékeztet (régén a gombák közé sorolták őket), de prokarióta mivoltuk miatt alapvetően különböznek azoktól. A *Streptomyces*-ek a sejtdifferenciálódás megértését célzó kutatások modellszervezeteivé váltak morfológiai differenciálódásuk bonyolultsága és az általuk termelt szekunder metabolitok miatt. 1940-50-es évektől a legfontosabb természetes forrásai a humán gyógyításban, az állatorvosi gyakorlatban és a mezőgazdaságban felhasználásra kerülő antibiotikumoknak (mint pl. streptomycin, erythromycin, tetracyclin, neomycin, chloramphenicol, vancomycin, gentamicin). Termelnek parazita-ellenes szereket (ivermectint), gomba-ellenes szereket (nystatint, amphotericin B-t), herbicideket (bialaphost), gyógyászatilag aktív metabolitokat – pl. immunszuppresszív szereket (rapamycint) és daganatellenes szereket (doxorubicint, bleomycint, mitomycint) – és sokféle, az élelmiszeriparban és más iparágakban hasznos enzimet (pl. kitinázokat, cellulázokat, hidrolázokat) is (Chater, 1993; Chater, 2006; Hopwood, 2007). A különféle *Streptomyces* izolátumokban 7000-nél is több másodlagos anyagcsereterméket fedeztek már fel (Bérdy, 2005), de a legtöbbjének még nem ismert a biológiai funkciója.

A morfológiai differenciálódás és az azzal szoros kapcsolatban álló antibiotikumtermelés szabályozásának teljes megértéséhez a transzkripció szintjén történő, részletesen tanulmányozott reguláció mellett a translációs és poszttranszlációs szabályozó mechanizmusok jellemzése is szükséges, eddig azonban ez utóbbiakról jóval kevesebb adatot, ismeretet tártak fel. A fehérjék mono-ADP-ribozilációja egy filogenetikailag ősi, reverzibilis poszttranszlációs módosítás, amelyet a mono-ADP-riboziltranszferáz enzimek katalizálnak. A prokariótákban található endogén mono-ADP-riboziltranszferázokról igen korlátozott a rendelkezésünkre álló ismeretanyag. *Streptomyces*-ekben ugyan már kimutatták fehérjék ADP-ribozilációját, de az eddig összegyűlt információk alapján nem ismerjük még pontosan sem a módosított fehérjéket, sem a módosítást végző enzimeket.

A kísérleteink alanyának választott *Streptomyces coelicolor* A3(2) a differenciálódás és a szekunder metabolit termelés kutatásában az egyik legismertebb modellszervezet. Munkám célja egyfelől *S. coelicolor* ADP-ribozilált fehérjeinek kimutatása, azonosítása, másfelől egy, feltételezhetően mono-ADP-riboziltranszferázt kódoló gén null mutánsának elkészítése volt.

A null mutáns fenotípusának analízisével, a „hiánytünetek” megfigyelésével az adott enzim funkciójának, az azonosított ADP-riboszilált fehérjéken keresztül pedig tágabb értelemben az endogén fehérje mono-ADP-ribosziláció *S. coelicolor*-ban betöltött szerepének megértésére törekedtünk.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A *Streptomyces* nemzetség és a *Streptomyces coelicolor* A3(2)

A *S. coelicolor* A3(2) a *Bacteria* doménbe, *Actinobacteria* törzsbe, *Actinobacteria* osztályba, *Actinobacteridae* alosztályba, *Actinomycetales* rendbe, *Streptomycineae* alrendbe, *Streptomycetaceae* családba, *Streptomyces* nemzetségbe tartozik (Kämpfer és mtsai, 2006). A *S. coelicolor* A3(2) (a továbbiakban *S. coelicolor*) legközelebbi rokona a *S. lividans*.

A *Streptomyces*-ek széleskörűen elterjedt Gram pozitív, szaprofita, spóratermelő talajbaktériumok, amelyek a talajok természetes baktérium populációjának 1-20%-át alkotják. Fontos globális szerepet játszanak a nehezen lebomló anyagok – pl. a cellulóz és a kitin – alkotóelemeinek az anyagforgalomba való visszajuttatásában (Goodfellow és Williams, 1983). A genus tagjai nem termelnek növényekre, állatokra vagy emberre nézve toxikus anyagokat, de van köztük néhány növényi és emberi patogén faj. Az egyik legismertebb a burgonyavarasodás kórokozója, a *S. scabies* (Hettiarachi és mtsai, 2008) és az embereken actinomycetomát okozó *S. somaliensis* (Develoux és mtsai, 2003). A *Streptomyces*-ek genomja a baktériumok között rendhagyóan magas G/C tartalmú, a *S. coelicolor* genomjának 70,2% a G/C tartalma. A *Streptomyces*-ek kromoszómája a többi baktériuméhoz képest szokatlanul nagy (8-10 Mbp) és lineáris, de tud körre záródni is. Bár sok, fonalasan növekedő actinobaktérium rendelkezik lineáris kromoszómával (*Saccharopolyspora*, *Actinoplanes*, *Micromonospora* és *Nocardia*), azonban távolról sem mindegyik (pl. *Frankia*), tehát a linearitás nem jár együtt minden esetben micéliális növekedéssel (Ventura és mtsai, 2007). A *S. coelicolor* lineáris kromoszómája mellett kétféle plazmid is található a citoplazmában (a lineáris SPC1 és a cirkuláris SPC2) (Haug és mtsai, 2003; Bentley és mtsai, 2004). Az általunk használt *S. coelicolor* M145 törzs azonban nem tartalmaz plazmidot. A plazmidok nélküli teljes genom szekvenálása 2001. júliusra fejeződött be. Akkoriban ez volt a legnagyobb (8 667 507 bp) ismert bakteriális kromoszóma (Bentley és mtsai, 2002; Pradella és mtsai, 2002), és ez volt az első eset, amikor azt találták, hogy egy baktérium több génnel rendelkezhet (7825 fehérjét kódoló gén), mint egy egyszerű eukarióta (Bentley és mtsai, 2002). Génjeinek száma az emberi gének számának kb. egynegyede. A genomjának extrém mérete magyarázatot adhat például arra, hogy hogyan képes ez a baktérium a rá jellemző oly nagyfokú diverzitásra, a tápanyagok oly széles skálájának hasznosítására és a vele együtt élő vagy versengő mikróbak jelenlétéhez és a változó körülményekhez való alkalmazkodásra. A

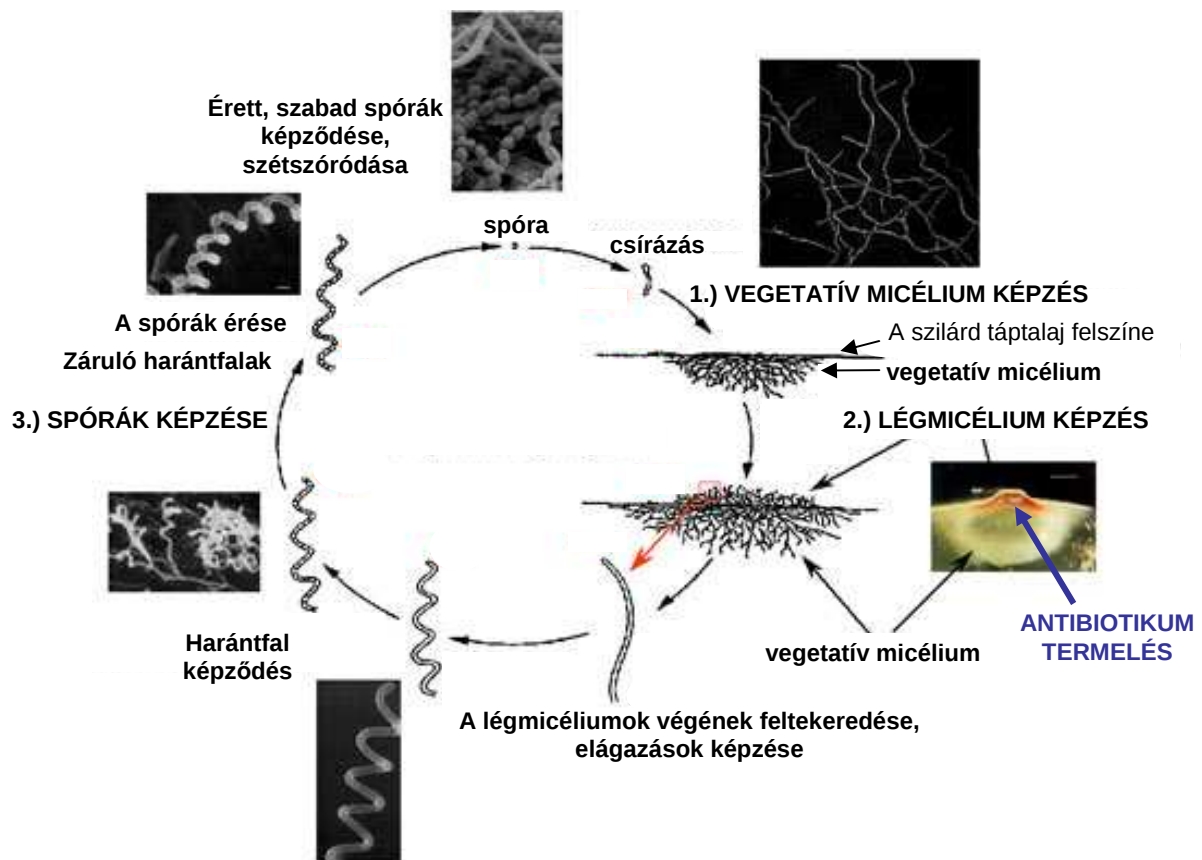
S. coelicolor kromoszómája 3 régióra osztható fel: a nagyjából a felét kitevő központi régióra, és a 1,5 Mbp és 2,3 Mbp hosszú karokra. *S. coelicolor*-ban a központi szakasz (SCO2050-től SCO5800-ig) túlnyomórészt konzervált, az *Actinomycetes*-ek között széleskörben megtalálható, a túléléshez nélkülözhetetlen géneket tartalmaz, nagyon hasonló a *Mycobacterium tuberculosis* és a *Corynebacterium diphtheria* genomjához és a *Mycobacterium leprae*-vel is mutat bizonyos egyezést (Thompson és mtsai, 2002). A 1,5 Mbp és 2,3 Mbp hosszú karokon is találunk konzervált géneket, de a törzsspecifikus, valamely antibiotikum bioszintéziséért felelős, klaszterekbe tömörült gének vannak többségben (Hsiao és Kirby, 2007). A kromoszóma közepén van a replikációs origó (oriC), két végén pedig jellegzetes telomer szerkezet található (Goshi és mtsai, 2002).

4.1.1. A *S. coelicolor* A3(2) életciklusa és a morfológiai differenciálódás génszintű szabályozása

A *S. coelicolor* nem spórázik folyékony tápközegben. Szilárd táptalajon (a talajban is) az életciklusa három fő fázisra osztható.

1.) Vegetatív (szubsztrát-) micélium képzése: A spóra megfelelő tápanyagellátottság esetén megduzzad, polarizálódik, és csíratömlőt hoz létre, melyből vegetatív hifa képződik (1. ábra). A csírázáshoz általában szén-dioxid, illetve kétértékű ionok, pl. Ca^{2+} -ionok szükségesek. A képződő csíracső csúcsi része intenzív növekedésbe és a genomi DNS folyamatos megkettőzésébe kezd. Az első harántfal képződése a hifát egy apikális és egy szubapikális részre tagolja. A szubapikális részen nem folyik intenzív sejtfalszintézis, csak replikáció, míg az apikális részen mindkét folyamat zajlik, ennek köszönhetően a vegetatív hifa tovább növekszik a táptalaj felszínén. A szeptumképződés sokkal ritkábban megy végbe, mint a replikáció, így szinciciális sejtfonal alakul ki (Chater, 1984). A szubapikális részen két harántfal között többszörös, nem kondenzált genomállomány, míg a legintenzívebb replikációs aktivitást mutató növekvő hifacsúcsban több mint 50 kromoszóma található (Ruban-Osmialowska és mtsai, 2006). A hifa sejtjei citoplazma hidakon keresztül kapcsolatban állnak egymással, a harántfalak csak a növekedés későbbi fázisában alakulnak ki teljesen. A növekvő sejtfonal idővel (15-18 óra) főként szeptumhoz közeli helyeken oldalirányú elágazásokat képez és behatol a táptalajba, ahol sűrű hifaszövedéket, ún. vegetatív vagy szubsztrátmicéliumot alakít ki (1. ábra) (Prosser és mtsai, 1993). Ezt a szakaszt a tápanyagok gazdagsága által lehetővé tett gyors exponenciális növekedés jellemzi. Ezáltal a

hifacsúcsok mindig újabb és újabb, még felhasználatlan tápanyagforrásokat érhetnek el (Chater és Losick, 1997).

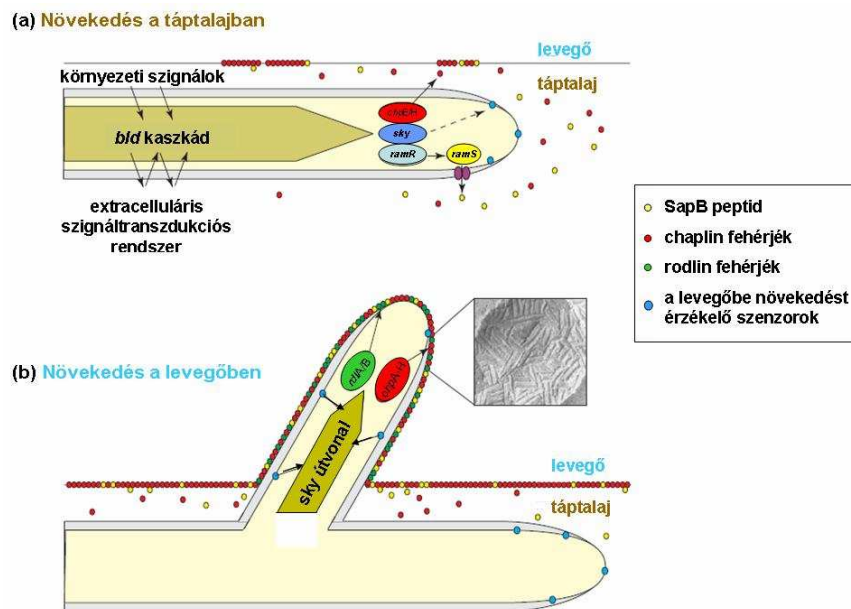


1.ábra. A *Streptomyces coelicolor* A3(2) életciklusa

(http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html nyomán)

2.) Légmicélium képzése: Ez a fázis akkor veszi kezdetét, amikor az intenzív növekedéshez szükséges tápanyagok szintje lecsökken. Ennek hatására a hifa a *bld* regulációs kaszkádhöz (lásd később) tartozó, diffúzibilis, extracelluláris szignál molekulákat bocsát ki, amelyek hatására a hifák növekedése lelassul, vagy stagnál (Willey és mtsai, 1993). A szubsztrát-micélium szövetéből kifelé, a táptalaj (vagy talaj) felszíne, a levegő irányába fehér légmicélium indul növekedésnek. A vegetatív hifák vizes közeghez alkalmazkodó, sima és hidrofíl felületével ellentétben ezek felülete hidrofób, mivel az extracelluláris térbe szekretálják az amfipatikus, felületaktív SapB (spore associated peptid B) peptidet, amely bevonja a hifa felszínét, egyrétegű filmet hoz létre a levegő-vizes tápközeg határán kb. felére csökkentve a víz felületi feszültségét (Willey és mtsai, 1993). A légmicéliumot borító hidrofób hártya kialakításában a még nagyobb felületi feszültség csökkentő hatással

rendelkező chaplin (chpE – H) és rodlin fehérjék is részt vesznek. Együttesen elősegítik a hifacsúcs levegő-víz határon való áttörését (Claessen és mtsai, 2006) (2. ábra). Azokat a *S. coelicolor* mutánsokat, amelyek szilárd táptalajon nem képeznek légmicéliumot és a telepek felszíne ennek következtében bőrszerű, „kopasz”, bald (*bld*) mutánsoknak nevezzük.



2. ábra. A *S. coelicolor* légmicélium képződésének modellje

(a) A *bld* kaszkád a SapB peptid, a chaplin E és H és a sky útvonál komponensek termelését indukálja. A szekretált chaplinekkel együtt a SapB a víz felületi feszültségét lecsökkentve a légmicélium növekedését iniciálja. (b) A termelődő rodlinok és chaplinek (ChpA-H) hidrofób bevonatot képeznek a növekvő légmicéliumon, amely megakadályozza azok aggregációját. A kis fotón ennek a bevonatnak tipikus scanning elektronmikroszkópos képe látható (Claessen és mtsai, 2006).

A légmicélium képzés fázisában veszi kezdetét a morfológiai differenciálódással szorosan együtt szabályozott, szekunder metabolitok (pl. antibiotikumok) termelődésével járó fiziológiai differenciálódás folyamata is (1. ábra), ezért ez a szakasz az idiofázis vagy produktív fázis nevet is viseli. A *S. coelicolor* legalább ötféle antibiotikumot termel, melyek közül a névadó kék („coeli-color” azaz égszínkék) actinorhodin a táptalajban és a telepeken cseppek formájában is jól megfigyelhető. Sok *bld* mutáns nem termel antibiotikumot. A szubsztrátmicélium 90-120 órás növekedése után a légmicélium, más néven reprodukzív micélium – amelyben a kromoszómák folyamatos osztódáson mennek keresztül – mintegy 9-14 óra alatt eléri végső hosszát (Chater és Losick, 1997; Chater, 2000).

3.) Spórák képzése: A légmicélium a záródó harántfalak révén önálló, egyszeres genetikai állománnyal rendelkező sejtekre tagolódik (1. ábra). Ez az ún. prespóra állapot. A

sporuláció bekövetkezésének időpontja táptalajfüggő: tápanyagban gazdag táptalajokon 6-7 napos tenyészetekre jellemző, de minimál táptalajon jóval korábban, kb. a 3.-4. napon már megfigyelhető (Chater, 2000). A sporulációs harántfalak abban különböznek a vegetatív harántfalaktól, hogy a dupla membránrétegen kívül dupla rétegű sejtfal is határolja őket, lehetővé téve a spórák lefűződését. A spórák fala érésük során megvastagszik, lekerekednek, szárazanyag tartalmuk megnő és pigmentálódnak, hogy a kedvezőtlen környezeti feltételeknek (szárazságnak, hőnek, nyomásnak) ellenállva, állatok vagy a szél segítségével tápanyagokban gazdag területekre vetődve új kolóniákat hozzanak létre (Chater és Losick, 1997). *S. coelicolor*-ban a légmicélium növekedés befejezését és a spórák képzésének ill. érésének folyamatát szabályozó gének a *whi* gének. Eddig 14 *whi* lókuszt mutattak ki a kromoszómán, a légmicéliumot képző, de fehérén maradó mutánsok megjelenési formája alapján korai (*whiA*, *B*, *G*, *H*, *I* és *J*) és késői (*whiD*, *E*, *F*, *L*, *M*, *O*) sporulációs géneket lehet megkülönböztetni. A korai gének termékei a normális spóraszeptumok kialakításában szükségesek. A késői *whi* gének közül a legtöbb információ *whiE*-ről van, amely a szürke poliketid spóra-pigment szintézisében fontos enzimet kódol (Molle és mtsai, 2000).

Nem csak a *bld* és a *whi* gének mutációja játszhat szerepet abban, hogy bald fenotípus jöhessen létre. Vannak légmicélium képzésben defektes (lelassult, megkésett fejlődést mutató mutánsok [jó példa erre a (p)ppGpp szintázt kódoló *relA* génben mutáns törzs megkésett légmicélium képzése] vagy meghatározott környezeti feltételek mellett légmicéliumokat egyáltalán nem képező bald fenotípust mutató mutánsok is (pl. fejlődési stádiumtól függően szabályozott katalázt kódoló *catB* mutáns törzs, a citrát-szintázt kódoló *citA* génjében mutáns törzs, stb.) (Chater, 2001).

4.1.2. A *Streptomyces coelicolor* A3(2) antibiotikumai és termelődésük szabályozása

Általában az adott antibiotikum termeléséhez és az ellene kialakuló rezisztenciához szükséges gének egy génklaszterbe tömörülnek és együtt regulálódnak. A *S. coelicolor* genom teljes szekvenciájának ismeretében eddig 23 szekunder metabolit génklasztert azonosítottak (Bentley és mtsai, 2002; Hsiao és Kirby, 2007). A *S. coelicolor* számos antibiotikumot termel: a pH indikátorként működő, savas közegben kék, lúgosban pirosra váltó poliketid actinorhodint (*act*), a piros undecilprodigiozint, a színtelen lipopeptid Ca^{2+} -függő antibiotikumot, a SCP1 plazmidon kódolt ciklopentanonokat, az ún. metilenomycint és a clorobiocint. Az actinorhodint nem alkalmazzák a gyógyászatban, de a termelődéséhez szükséges géneket felhasználták más fajokban új antibiotikum származékok létrehozására

(Demain, 1988). A prodigininek (melyek egyike az undecilprodigiozin) és módosított változataik ígéretes daganat-ellenes szerek és immunszuppresszánsok (2006 novembere óta folyik a klinikai kipróbálásuk) (Stanley és mtsai, 2006). A clorobiocinból származtatható új antibiotikumok DNS giráz gátló hatásuk miatt a jövőben gyógyászati célokra is felhasználhatóvá válhatnak (Wolpert és mtsai, 2007).

Az antibiotikum termelést több szintű, összetett regulációs rendszer szabályozza, amelynek egyes elemei maguk is az általuk szabályozott génklaszterben találhatóak. Az antibiotikumok termelésére ható regulátorok egymással kölcsönhatásban egy bonyolult hálózatot alkotnak, amely szorosan kapcsolódik a morfológiai differenciálódásra ható szabályozó rendszerekkel (Bibb, 1996; Chater, 2001).

4.1.2.1. Az actinorhodin termelése és transzportja

Az actinorhodin szintéziséért felelős enzimeket kódoló gének a termelést szabályozó *actII-ORF4* útvonalspecifikus gén és az actinorhodin rezisztanciával kapcsolatos transzporthoz szükséges génekkel együtt alkotják a kb. 22 kbp nagyságú actinorhodin génklasztert (Taguchi és mtsai, 2007).

Az actinorhodin bioszintézis első lépése a 2 szénatomos acetyl csoportokból képződő lineáris 16 C atomos váz előállítása a II-es típusú poliketid szintáz komplex által (actI régió elemei). Mielőtt a termelő antibiotikum intracelluláris koncentrációja elérné a káros szintet, a bioszintézis út köztitermékei indukálják az (*act-ORF2* kódolta) actinorhodin transzporter szintézisét. Az actinorhodin γ -actinorhodinná átalakulva kerül ki a sejtől. Az átalakító enzim (bár génje, az *actII-ORF3* együtt expresszálódik a transzporter génjével) nem vesz részt a transzportban. Az *actII-ORF2* mellett az *actVA-ORF1* terméke, egy integrált membrán protein is szükséges még az actinorhodin exportjához (Caballero és mtsai, 1991a; Fernandez-Moreno és mtsai, 1991; Bystrykh és mtsai, 1996; Tahlan és mtsai, 2007).

Az *actII-ORF4* és az *actII-ORF2* génekben levő TTA triplet arra utal, hogy a *bld* kaszkádban részt vevő *bldA* gén terméke szerepet játszik az actinorhodin termelés és szekréció szabályozásában. A *bldA* egy leucint szállító tRNA^{Leu}_{UUA}. A leucin UUA kodonja nagyon ritkán fordul elő a 70-75% G/C tartalmú *Streptomyces* mRNS-ben, mivel a TTA a legritkább triplet a *Streptomyces* génekben. Így kézenfekvő, hogy a *bldA* gén szerepet játszik a leucint kódoló TTA tripletet tartalmazó gének expressziójának szabályozásában. A leucinnal töltött tRNA szintje határozza meg 145 TTA-val rendelkező gén termékeinek szintjét

(Chandra és Chater, 2008). A morfológiai differenciálódás és az antibiotikum bioszintézis tehát részben közös szabályozás alatt áll.

4.1.3. Fehérjék szekréciója a *Streptomyces coelicolor*-ban

A Secretory (Sec) útvonal egy általános szekréciós mechanizmus, amely univerzálisan megtalálható az eubaktériumokban, az archeákban és az eukariótákban is. Az eukarióta sejtekben a citoplazmából nem csak a sejten kívüli térbe, hanem az endoplazmatikus retikulumba is így jutnak a fehérjék. A Gram pozitív baktériumokban ez a mechanizmus juttatja ki a legtöbb szekretált fehérjét az extracelluláris térbe. A prokarióták közül *Eschericia coli*-ban jellemezték a legrészletesebben a Sec útvonalban résztvevő fehérjéket. Ott egy heterotrimer fehérjekomplex (SecY/SecE/SecG) alkotja a membránon keresztülő pórust és az ehhez kapcsolódó SecA citoplazmatikus alegység hasznosítja az ATP energiáját a transzlokációhoz. A SecYEG komplexhez egy másik heterotrimer is kapcsolódik, ami a SecD, SecF és YajC fehérjékből épül fel. Az extracelluláris térbe szekretálódó fehérjék szignálpeptidjét a transzlációt követően a SecB chaperon ismeri fel és a transzlokáz SecA alegységéhez köti. A membránfehérjék esetében a fehérjét éppen szintetizáló riboszómát a szignálfelismerő részecske (signal recognition particle, SRP, ami az Ffh GTPázból és kis stabil RNS-ekből áll) az FtsY SRP receptor segítségével közvetlenül a transzlokázhoz rögzíti, így az éppen szintetizálódó fehérje azonnal transzlokálódik is. A *Streptomyces*-ek genomjában is jelen vannak az SRP-t alkotó RNS-eket és az Ffh fehérjét kódoló gének. A *S. coelicolor* kromoszómáján a SecY, SecE, Sec G, Sec D és Sec F fehérjék génjei egymást követve vannak jelen. A SecG nem esszenciális tagja a transzlokáznak a baktériumokban. *Streptomyces lividans*-ban a *secG* gén deléciója nem letális, de lecsökken a szekretált fehérjék mennyisége és nem sporulál a mutáns törzs. A szekréciós szignálpeptidet a csatorna pórúsán éppen áthaladó vagy már átjutott, még nem feltekeredett polipeptidlánról egy, a külső membránfélhez rögzült I. típusú szignálpeptidáz hasítja le, amely a *S. lividans*-ban jellemzően a SipY, de lehet a SipW, a SipX és a SipZ is (Palmer és Hutchings, 2011).

A Tat (twin-arginine translocase, iker-arginin-transzlokáz) útvonal egyes baktériumokban és Archeákban jelenlévő szekréciós útvonal, amely a már kész, általában nem fehérje alkotórészt, kofaktort is kötő összetett fehérjéket juttatja ki a membránon át, megőrizve azok tökéletesen kialakult három-dimenziós szerkezetét. A Tat útvonal az eukariótákban kevés kivételtől eltekintve nincs jelen, csak a növényi sejtek plasztiszainak tilakoidmembránjában. Általában nem esszenciális az életben maradáshoz, sok baktériumban

inaktivált állapotban van. A *Streptomyces*-ekben azonban a Sec útvonallal analóg, általános szekréciós útvonalnak tartják, mivel sok, kofaktort nem kötő fehérje is szekretálódik ezen az úton. A *Streptomyces coelicolor*-ban kb. 80 fehérjéről feltételezik, hogy ilyen módon jut ki a sejtéből. A Tat transzlokázt két vagy három transzmembrán alegység (Tat A és C vagy Tat A, B és C alegység) alkotja. A fehérjék transzportjához proton gradiens szolgáltatja az energiát és a membránon keresztülhaladt fehérjéről, a Sec útvonalhoz hasonlóan, egy I. típusú szignálpeptidáz vágja le a szignálpeptidet (Natale és mtsai, 2008).

A Sec és Tat szekréciós szignálszekvenciák hasonlóak abban, hogy 3 egységből állnak: a poláros **n** régióból, a hidrofób **h** régióból és egy szintén poláros **c** régióból, továbbá ugyanaz a szignálpeptidáz hasítja le mindkettőt a már kijutott fehérjéről. A Sec szignálpeptidtől eltérően a Tat útvonalhoz tartozó szignálpeptidnek hosszabb az **n** régiója, továbbá az **n** és **h** régió határán egy konzervált, eredetileg S/T-R-R-x-F-L-K aminosav szekvenciaként leírt motívumot tartalmaz. Számos Tat-útvonallal szekretált fehérje tanulmányozása alapján a Tat szekréciós szignálszekvenciát Z-R-R-x-Φ-Φ szekvenciára lehet egyszerűsíteni, amelyben a Z bármilyen poláros aminosavat, Φ pedig valamilyen hidrofób aminosavat jelöl (Natale és mtsai, 2008). A *S. coelicolor*-ban átlagosan 35 aminosav hosszú egy teljes Tat szignálpeptid, de esetenként elérheti a 60-80 aminosavnyi hosszúságot is. A Sec szignálpeptid szekvenciájában nincs jellegzetes, konzervált szekvencia motívum, kivéve a **c** régióban a szignálpeptidáz hasító helyét, ahol a hasítás helyétől –3 és –1 helyzetben bármilyen, kis neutrális oldallánccal rendelkező aminosav lehet, a leggyakoribb az Ala-x-Ala motívum. A Tat szignálpeptid **c** régiójában ugyanezen hasítóhely mellett még 1 vagy 2 bázikus aminosav oldallánc is található, amely Sec útvonalat elkerülő szignálként funkcionál. A legfontosabb megkülönböztető jegy a két útvonal szignálpeptidjében a **h** régió hidrofóbitásának mértéke. A Sec szignálpeptid **h** régiója erőteljesebben hidrofób, mint a Tat peptidjének azonos szakasza. A hidrofóbitás növelésével a Tat útvonalról a Sec útvonalra terelhető az adott fehérje szekréciója (Palmer és Hutchings, 2011).

A lipoproteinek a Gram pozitív baktériumokban – a Gram-negatívokban levő periplazmatikus fehérjék megfelelőiként – membránhoz kötött fehérjék, amelyek elsősorban a Sec útvonalon transzlokálódnak, de emellett *Streptomyces*-ekben fontos a Tat útvonal is a lipoproteinek kijutásában (Nielsen és Lampen, 1982; Berks és mtsai, 2000; Valente és mtsai, 2007). A 3 régió ezek szignálpeptidjében is felismerhető. A **c** régió végén egy jellegzetes konzervált aminosav motívum, a lipobox található $[L_{-3}-(A/S/T)_{-2}-(G/A)_{-1}-C_{+1}]$, amelyben a hasítás helye melletti cisztein abszolút konzervált (Rahman és mtsai, 2008). Ehhez a ciszteinhez a diacilglicerol lipoprotein transzferáz (Lgt) enzim lipidet kapcsol. Ezt követően

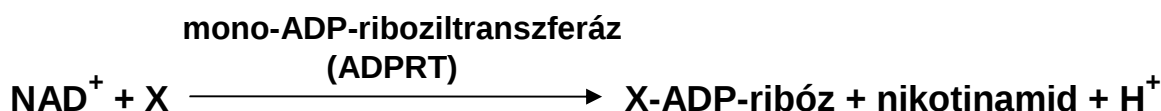
egy II. típusú szignálpeptidáz, az Lsp vagy liporotein szignál peptidáz felismeri a módosított ciszteint és úgy vágja le a szignálpeptidet, hogy a módosított cisztein marad az érett fehérje N-terminális végén, az ehhez kapcsolt lipid pedig a fehérjét a membrán külső oldalához rögzíti (Hutchings és mtsai, 2009). Az érett liporoteinek egy része kulcsszerepet játszik a szignál transzdukcióban és a tápanyagok felvételében, mint pl. ATP-kötő kazetta (ABC)-transzporterek szubsztrát kötő alegységei (Bertram és mtsai, 2004; Hutchings és mtsai, 2006). A *S. coelicolor* proteomjának jelentős hányada (7,8%) ABC-transzporter komplexek fehérjeit kódolja (Berthram és mtsai, 2004).

4.2. Az ADP-riboziláció és az ADP-riboziltranszferázok

A NAD^+ -ból ADP-ribóz keletkezésével járó ADP-ribozilációs reakciók közé tartozik a mono-ADP-riboziláció, a poly-ADP-riboziláció, az ADP-ribóz ciklizáció és az O-acetil-ADP-ribóz képzés is (Glowacki és mtsai, 2002; Hassa és mtsai, 2006). A poli-ADP-ribozilációt katalizáló enzimek [poly(ADP-ribóz) polimerázok, PARP-ok] néhánytól 200-ig terjedő számú ADP-ribóz egységből álló, elágazó polimereket kapcsolnak O-glikozid kötéssel a megfelelő fehérjék glutamát oldalláncához (Smith, 2001). A PARP-ok nem találhatók meg a prokarióta sejtekben, de a terminálisan differenciálódott granulociták és az élesztősejtek kivételével mindenféle eukarióta sejtben kimutatták őket (Ame és mtsai, 2004). Az emlősökben használt új elnevezésük, az ARTD név arra utal, hogy a diftéria toxinhoz hasonlóak (Hottinger és mtsai, 2010). Függetlenül attól, hogy mely élőlényben működnek, a mono- és poli-ADP-ribozilációt katalizáló enzimek szoros szerkezeti és működésbeli hasonlóságot mutatnak egymással (Seman és mtsai, 2004; Ame és mtsai, 2004; Hassa és Hottinger, 2008). Az emlős PARP/ARTD10 és az ARTD15 bizonyítottan mono-ADP-riboziltranszferázok (Kleine és mtsai, 2012; Di Paola és mtsai, 2012) (2. Táblázat).

A fehérjék mono-ADP-ribozilációja filogenetikailag ősi, reverzibilis, sztereospecifikus és kovalens poszttranszlációs módosítás. A mono-ADP-riboziltranszferáz (ADPRT) enzim a NAD^+ -ban található nagy energiájú N-glikozil-kötésben tárolt kötési energiát felhasználva a βNAD^+ -ból származó ADP-ribózt az akceptor fehérje specifikus aminosav oldalláncához kapcsolja S- vagy N-glikozid kötéssel egy nikotinamid molekula és H^+ szimultán felszabadulása közben (Hayaishi és Ueda, 1985; Oppenheimer és Handlon, 1992; Okazaki és Moss, 1996; Okazaki és mtsai, 1996; Seman és mtsai, 2004) (3. ábra). Az akceptor fehérjén az ADPRT specifikitásától függően arginin, cisztein, aszparagin, aszparaginsav, glutaminsav, diftamid vagy foszfoserin oldalláncok ADP-ribozilálódhatnak. Mono-ADP-riboziláció nem

csak fehérjék valamely aminosav oldalláncán történhet. Makromolekula (DNS, RNS), szabad aminosav, peptid vagy kis molekula (mint pl. a rifampicin, agmatin) is lehet ADP-ribóz akceptor (Hassa és mtsai, 2006).



3. ábra: Mono-ADP-ribozilációs reakció, egyszerűen

X: akceptor, ami lehet fehérje, DNS, RNS, szabad aminosav vagy kis molekula, pl. antibiotikum is (Hassa és mtsai, 2006).

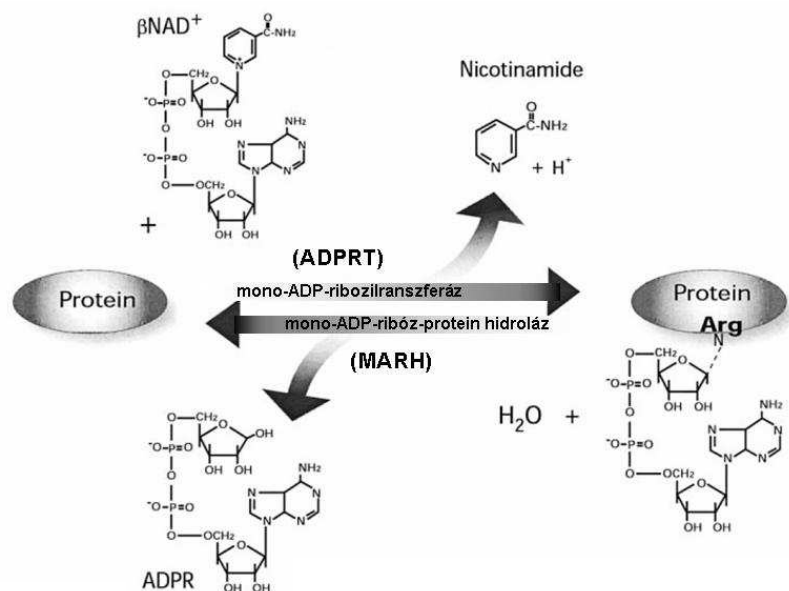
Az ADP-ribóz aránylag nagy térkitöltésével szterikusan gátolhatja a módosított fehérjének más molekulákkal történő kapcsolódását, ami többnyire a célfehérje inaktiválódását vonja maga után (Corda és Di Girolamo, 2003). Az ADP-ribóz két, negatív töltést hordozó foszfát csoportot kapcsol a fehérjéhez, ezért kötődése megváltoztatja a fehérje konformációját vagy akár egy új dokkoló helyet is teremthet az ADP-ribóz-kötő doménnel rendelkező partner fehérjék számára (Laing és mtsai, 2011). Létezik nem enzimatis típusa is a mono-ADP-ribozilációnak, amikor Schiff-bázis képzéssel a fehérjék lizin vagy cisztein oldalláncaihoz kapcsolódhat szabad ADP-ribóz molekula (Okazaki és Moss, 1996).

Az enzimatis mono-ADP-riboziláció a bakteriális toxinok patogén mechanizmusaként vált először ismertté (Collier, 1967). A bakteriális toxinokon kívül vírusokban, prokariótákban, archeákban és eukariótákban is számos endogén és szekretált mono-ADPRT létezik (Okazaki és Moss, 1996; Okazaki és Moss, 1999; Brünne és Lapetina, 1989; Devez-Alvarez és mtsai, 2001; Hayaishi és Ueda, 1985; Lowery és Ludden, 1990; Ludden, 1994; Corda és Di Girolamo, 2003, Di Paola és mtsai, 2012) (1. Táblázat). A gerinces eukarióták közül főleg madarakban és emlősökben fordulnak elő mono-ADP-riboziltranszferázok (Moss és mtsai, 1997; Di Girolamo és mtsai, 2005). Feltehetően horizontális géntranszferrel jutottak át a baktériumokból, az emberi genomban is több bakteriális eredetű ADPRT génszekvenciát találtak (Lander és mtsai, 2001). Az „alacsonyabbrendű” eukariótákban nem jellemzőek (nincsenek *Coenorhabditis*-ben, de rovarokban és az élesztőkben előfordulnak) (Pallen és mtsai, 2001; Glowacki és mtsai, 2002; Massignani és mtsai, 2004).

4.2.1. A fehérje mono-ADP-ribóziláció, mint reverzibilis posztranszlációs módosítás

A fehérje mono-ADP-ribózilációt a mono-ADP-ribóz-protein glikohidroláz (MARH) enzimek teszik reverzibissé az ADP-ribóz eltávolításával (Hayaishi és Ueda, 1985; Lowery és Ludden, 1990; Ludden, 1994) (4. ábra). Eukariótákban számos különböző, intracelluláris mono-ADP -ribóz-protein-hidroláz aktivitással rendelkező fehérje ismert (Koch-Nolte és Haag, 1997; Okazaki és Moss, 1996; Okazaki és mtsai, 1995), amelyek különböző enzimcsaládokba oszlanak. Az ADPRT és MARH enzimek, összehangolt működésük révén, rugalmas szabályozási rendszert képesek biztosítani a sejteknek (Hayaishi és Ueda, 1985; Lowery és Ludden, 1990; Ludden, 1994).

A reverzibilis ADP-ribózilációs ciklus létét először a fotoszintetizáló és nitrogén-fixálásra is képes *Rhodospirillum rubrum* baktériumban igazolták (Ludden, 1994). Ebben a rendszerben az endogén dinitrogenáz reduktáz ADP-ribóziltranszferáz (DRAT) a N_2 -t redukáló redukáló dinitrogenáz komplex egyik kulcs fehérjét, a dinitrogenáz reduktázt inaktíválja ADP-ribózilációval. Az enzim újbóli aktiválásához az ADP-ribózt a dinitrogenáz reduktáz ADP-ribózilarginin glikohidroláz (DRAG) távolítja el. Az ADP-ribóziláció egy kulcsfontosságú regulációs mechanizmus a sok ATP-t igénylő nitrogén-fixálás folyamatának



4. ábra. A mono-ADP-ribóziláció, mint reverzibilis posztranszlációs módosítás egy arginin specifikus ADPRT példáján bemutatva (Corda és Di Girolamo, 2003 alapján)

a baktérium pillanatnyi igényei szerinti időleges leállításában. Több nitrogén-kötő baktériumban is működik hasonló szabályozó rendszer, de nem minden esetben ismerjük az endogén ADPRT enzimekkel párt alkotó MARH enzimeket (Fu és mtsai, 1989; Halbleib és Ludden, 2000, Yakunin és Hallenbeck, 2002). A *S. coelicolor* genomjában is megtalálhatóak a feltehetően MARH enzimeket kódoló gének (saját szekvenciaanalízis). Endogén ADP-ribozilációs reakcióként megemlíthető a *Rhizobium meliloti*-ban, *S. griseus*-ban, *Synechocystis* fajokban és a *Rhodospirillum rubrum*-ban kimutatott glutamin szintetáz enzim módosítása (Liu és Kahn, 1995; Penyige és mtsai, 1994; Silmann és mtsai, 1995; Woehle és mtsai, 1990), és a *Myxococcus xanthus* extracelluláris fonalainak ADP-ribozilációja (Eastman és Dworkin, 1994). Találtak endogén módon ADP-ribozilált fehérjéket még *Pseudomonas maltophilia*-ban, *Klebsiella pneumoniae*-ben, *Bacillus subtilis*-ben és *Mycobacterium smegmatis*-ban is (Edmonds és mtsai, 1989; Geipel és mtsai, 1996; Huh és mtsai, 1996; Serres és Ensign, 1996). Napjainkban a genomiális szekvenciákat és fehérje térszerkezeteket gyűjtő adatbázisok rohamosan növekedő információtartalmának és a bennük való keresési stratégiák fejlődésének köszönhetően *in silico* egyre több, a DRAT-DRAG rendszerrel analóg rendszert találnak a baktériumokban. Ezek között vannak olyanok, amik a baktérium restrikciós-modifikációs enzimeinek szabályozásában vesznek részt (de Sousa és Aravind, 2012).

4.2.2. A bakteriális toxinok

A bakteriális mono-ADP-riboziltranszferáz enzimek túlnyomó részét a toxinok közé sorolhatjuk (1. táblázat), amelyek a kórokozó sejtéből a külvilágba szekretálódott fehérjékként eukarióta intracelluláris célfehérjéket ADP-ribozilálnak és ezzel végsősoron elpusztíthatják a sejtet. Szubsztrát-specifitásuk és szerkezetük szerint is több csoportba sorolhatóak. Minimum hat aminosav-specifikus alosztálya van a bakteriális ADPRT-oknak: az arginin-, aszparagin-, aszparaginsav-, glutaminsav-, cisztein- és diftamid-specifikus ADPRT-ok (Hassa és mtsai, 2006). Az arginin-specifikusak a leggyakoribbak, közéjük sorolható pl. a kolera toxin (CT), a DRAT, az *E. coli* hőérzékeny enterotoxinja, a *Clostridium botulinum* C2 toxinja, a *Bacillus thuringiensis* termelte VIP2 (vegetative insecticidal protein), a *Salmonella enteritidis* SpvB-je és a *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxinja (Bornancin és mtsai, 1992; Fieldhouse és Merrill, 2008). Nem csak a bakteriális ADPRT enzimek, hanem a T4 bakteriofág Alt enzime és az emlősökben található ART1 és ART2 is arginin oldalláncot módosítanak a célfehérjéjükön

(Aktories és mtsai, 1986; Ludden, 1994; Rappuoli és Montecucco 1997; Han 1999, Otto 2000). A diftéria toxin (Wilson és Collier, 1992) és a *Vibrio cholerae* újonnan felfedezett

1. Táblázat. Mono-ADP-ribozilációt katalizáló enzimek és szubsztrátjaik prokariótákban (Corda és Di Girolamo, 2003 és Fieldhouse és Merrill, 2008 alapján, Deng és Barbieri, 2008 adataival módosítva)

ADPRT enzim	Mely élőlény termeli	Szubsztrátja / a módosítás helye	Az ADP-riboziláció hatása
<u>TOXINOK</u>			
Exotoxin S típusúak (a Rho-GTPáz aktivátor proteinhez kötődik):			
ExoS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	vimentin, Ras, Rab3-4, Ral, Rap 1A, 2	szétkapcsolja a Ras útvonalat
AexT	<i>Aeromonas salmonicida</i>	aktin / Arg177	gátolja az aktin polimerizációt
ExoT	<i>Pseudomonomonas aeruginosa</i>	CrkI,II	gátolja a fagocitózist
VopT	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ras	szétkapcsolja a Ras útvonalat
C2 típusúak (AB, A megduplázódásával jött létre):			
Vip2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	aktin/Arg177	gátolja az aktin polimerizációt
Iota Ia	<i>Clostridium perfringens</i>		
CdtA	<i>Clostridium difficile</i>		
Sa	<i>Clostridium spiroforme</i>		
C2-I	<i>Clostridium botulinum</i>		
SpvB	<i>Salmonella enteritidis</i>		
C3 típusúak (csak A):			
C3bot1 és bot2	<i>Clostridium. botulinum D, C bakteriofág</i>	Rho A, B és C / Asn41	gátolják a Rho GTPáz aktivitását és az aktin filamentumok széthullását okozzák
C3lim	<i>Clostridium limosum</i>		
C3cer	<i>Bacillus cereus</i>		
EDIN-A B és C	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rho A, B, C, E, Rnd3	
SpyA ^c	<i>Streptococcus pyogenes</i>	vimentin, tropomiozin, aktin / Arg17	aktin filamentumok leépülése
CT-PT típusúak (AB₅, több polipeptid):			
kolera toxin	<i>Vibrio cholerae</i>	G _{s-α} / Arg187	gátolják a GTP-áz aktivitást és állandó adenilát-cikláz stimulációt okoznak
LT-A, IIA, IIB	<i>Escherichia coli</i>		
NarE	<i>Neiseria meningitidis</i>	Arg	ismeretlen
pertussis toxin	<i>Bordatella pertussis</i>	G _{i-α} , G _{t-α} / Cys365	szétkapcsolja a G proteint a receptortól
CARDS	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ismeretlen	ismeretlen
Mtx	<i>Bacillus sphaericus</i>	(EF-Tu) ismeretlen/Arg	ismeretlen
DT típusúak (AB típusú , 3 doménes polipeptid):			
diftéria toxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	EF2 / diftamid715	gátolják a fehérjeszintézist
cholix	<i>Vibrio cholerae</i>		
ExoA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
AexU típusúak:			
AexU, T AH3	<i>Aeromonas hydrophylia</i>	ismeretlen	ismeretlen
Egyéb CT típusúak:			
HopU1	<i>Pseudomonas syringae</i>	kloroplaszt- és glicin gazdag-RNS kötő fehérjék	az RNS anyagcserére hat, gyengíti az immunitást
<u>INTRACELLULÁRIS ENZIMEK</u>			
DRAT	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	dinitrogenáz reduktáz	gátolia

		/ Arg101	a dinitrogenáz reduktázt
Arr-ms	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	rifampicin, ismeretlen	rifampicin rezisztenssé teszi a baktériumot; ismeretlen
Arr-sc	<i>Streptomyces coelicolor</i>		

cholix toxinja a 2-es elongációs faktor (eEF-2) diftamid oldalláncát módosítja (Jørgensen és mtsai, 2008).

A „klasszikus” bakteriális ADPRT exotoxinok felépítése, negyedleges szerkezete nagyon sokszínű, de általában az A:B modellt követi, amelyben az A domén az enzimaktivitással rendelkező toxin alegység, a B domén pedig az eukarióta sejt felszínén lévő specifikus receptorhoz kötődik és/vagy transzlokációs domén, ami az A domént bejuttatja a sejtbe. Az A és B egyetlen polipeptid doménjei is lehetnek (pl. DT) vagy különböző gének által kódolt, azonos szignálpeptiddel a periplazmatikus térbe kijutó és ott holoenzimé összeálló, önálló polipeptidek (pl. CT, PT) is. A toxinok célfehérjéjük és alegység szerkezetük alapján hét csoportba sorolhatóak (1. Táblázat) (Fieldhouse és Merrill, 2008). Az AB-szerkezetű, C2 típusba sorolható bináris toxinok A alegysége nem valódi B alegységgel, hanem egy Rho-GTPáz aktivátor proteinnel kapcsolódva az aktint ADP-riboszilálja. A C3 típusúak egyetlen kis A alegységből állnak és szubsztátjaik a kis G proteinek (pl. a Rho). A CT-PT típusúak több polipeptidből összeálló bináris toxinok, AB₅ szerkezettel. Az ide sorolható kolera toxin CT-A alegysége a gazdasejt felszínéhez való kötődésért felelős alegység-pentamerrel alkot komplex szerkezetet. Az összes ide tartozó toxin (pertussis toxin, *E. coli* hőérzékeny toxinjai, stb.) a G proteinek veszi célba. A diftéria toxinhoz hasonló szerkezetű toxinok az eEF-2 diftamid oldalláncát módosítják. Ezek az enzimek nagyméretű, három doménes polipeptidek, amelyekben a katalitikus alegység mellett külön a receptor kötéseért és külön a membránon való átjutásért felelős B domén található (Holbourn és mtsai, 2006, Fieldhouse és Merrill, 2008, Deng és Barbieri, 2008).

4.2.3. Az ADPRT enzimek konzervált szekvencia motívumai

Az ADPRT-ok aminosav szekvenciája igen plasztikus, azaz nagy variabilitást mutat a különböző enzimekben. Azonban minden eddig ismert ADPRT tartalmaz minimum három konzervált motívumot, amelyek az aktív centrum konzervatív szerkezetét alkotva a katalitikus aktivitásban és a szubsztátspecifitásban játszanak lényeges szerepet, és amelyekben csak néhány aminosav erősen konzervált. Ezen oknál fogva két, tetszőlegesen kiválasztott ADPRT szekvenciája csak kis mértékben hasonló. Sok ADPRT-nél az aminosav sorrend 29-64%-ban azonos, de vannak olyanok is köztük, amelyekben még ennél is alacsonyabb ez az érték. Ez

megnehezíti az ADPRT-k genomi szekvenciákból történő *in silico* azonosítását (Domenighini és Rappuoli, 1996; Koch-Nolte, 1996; Bazan és Koch-Nolte, 1997; Okazaki és Moss, 1998). Az utóbbi években átütő eredményt hozott az ún. szerkezet alapú szekvencia illesztéseket használó megközelítés, amelyben a legkonzervatívabb aminosavak (tulajdonképpen a már megismert térszerkezetekből adódóan fontosnak tartott szekvencia elemek) közötti hasonlóságot keresik, míg a variábilis köztes régióknak kisebb jelentőséget tulajdonítanak. A megszekvenált genomokat és ismert terciér szerkezetű enzimfehérjéket tartalmazó, egyre bővülő adatbázisokban a PSI (Position-specific iterative)-BLAST (basic local alignment search tool) (Altschul és mtsai, 1997) keresésekkel napjainkban egyre több, eddig ismeretlen toxint és új típusú ADPRT enzimeket kódoló gént azonosítanak, továbbá korábban különlegesnek vélt enzimeket kódoló gének széles körben elterjedt ortológjai válnak ezáltal ismertté és egyes humán PARP és ADPRT fehérjék bakteriális eredetére is fény derül (Fieldhouse és Merrill, 2008; de Souza és Aravind, 2012).

Korábban nyolc bakteriális toxin és a házi tyúk PARP kristályszerkezete alapján arra következtettek, hogy a legtöbb ADPRT enzimben 5 konzervált β -lemez és egy α -hélix alkotja az aktív centrumot. Ez a NAD^+ -kötőhelyet alkotó és a katalitikus aktivitású aminosavdallancokat térben egybefoglaló szerkezet minden enzimben kicsit más, egyedi topológiák szerint szerveződik (Glowacki és mtsai, 2002).

Három konzervált aminosavszekvencia motívum, pontosabban 3 erősen konzervált aminosav és a kevésbé konzervált környezetük játszik jelentős szerepet az enzim működésében. Az ötödik β -lemezben lévő ún. katalitikus glutaminsav (E) a legszigorúbban konzervált aminosav minden eddig megismert ADPRT-ban (Carrol és Collier, 1984). Vannak azonban olyan ADPRT enzimek (*Mycobactérium smegmatis* Arr-ms és homológjai), amelyekben ezt a glutaminsavat aszparaginsav helyettesíti. Éppen ezen enzimek révén tudjuk, hogy maga a konzervált aminosavmotívumok által létrehozott három-dimenziós szerkezeti váz a lényeges az ADP-ribosziltranszferáz aktivitáshoz (Baysarowich és mtsai, 2008). A legtöbb ADPRT-ban a másik két erősen konzervált aminosav az első és a második béta lemezen található arginin (R) és szerin (S). De két diftamid specifikus mono-ADP-ribosziltranszferázban, a már említett Arr-ms-ben és homológjaiban, és minden ismert PARP-ban hisztidin (H) és tirozin (Y) található az aktív centrumban. Ez a különbség két osztályba osztja az ADP-ribosziltranszferáz enzimeket: a kolera toxinhoz hasonló, vagyis CT-csoport, más néven az I-es ART osztály *R-S-E* motívumot, a diftéria toxinra hasonlító DT-csoport, azaz a II. ART osztály pedig *H-Y-E* motívumot tartalmaz (Domenighini és Rappuoli, 1996; Koch-Nolte és mtsai, 1996; Bazan és Koch-Nolte, 1997; Fieldhouse és Merrill, 2008).

Az R-S-E csoportban az említett 3 konzervált aminosav (amelyeket aláhúzással emelünk ki a motívumokban) három β -lemezen helyezkedik el. Az első β -lemezen található az (1.) *aromás aminosav* - arginin (röviden R) motívum mélyen az enzim katalitikus aktív centrumának üregében helyezkedik el és a NAD^+ megkötésében és az aktív centrum integritásában fontos. A második β -lemezen van a (2.) *hidrofób aminosav* – szerin – treonin – szerin - *hidrofób aminosav* motívum (rövidebben: S-T-S motívum) (jellemzően egy α -hélix követi), amely az üreg alapját képezi és a NAD^+ szubsztrát pozícionálásában vesz részt. Az ötödik, apoláris β -lemez illetve az ennek határán levő, a negyedik és ötödik β -lemezt összekötő „aktív hely” hurok, más néven az ARTT hurok (ADP-ribosylating-turn-turn loop) tartalmazza a (3.) *glutamin vagy glutaminsav* - *bármely aminosav* - glutaminsav (röviden: Q/E-X-E) motívumot, amelynek poláros oldalláncai az aktív centrum üregébe nyúlnak. A második, aláhúzott glutaminsav a legkonzerváltabb és egyben a katalitikus aktivitásban kulcsszerepet játszó katalitikus glutaminsav, amely esszenciális az ADP-ribóz átvitelében (transzferáz aktivitás), de a NAD^+ hasításában nincs szerepe. H-kötést létesít a ribóz 2'-OH csoportjával, így a köztiterméket (ami feltételezhetően oxokarbénium ion) stabilizálja. Végül az ADP-ribóz kovalensen kötődik a fehérje specifikus aminosav oldalláncához (Domenighini és Rappuoli, 1996; Holbourn és mtsai, 2006).

E-X-E motívumot tartalmaznak az ismert mono-ADP-ribosziltranszferázok legnagyobb alcsaládját alkotó arginin specifikus ADPRT-ok. Ezekben az ARTT hurok esszenciális a szubsztrát kötéséhez (Glowacki és mtsai, 2002; Holbourn és mtsai, 2006). *Q-X-E* motívum található viszont a *Clostridium* fajok, a *Bacillus cereus* és különböző *Staphylococcus aureus* fajok által termelt C3-szerű exoenzimekben. A *Clostridium limosum* C3 enzime aszparagin oldalláncot módosít a célfehérjén. Ha az enzim *Q-L-E* motívumában pontmutáció segítségével a glutamint glutaminsavvá (*E-L-E*) változtatjuk, akkor az enzim elveszíti aszparagin specifitását és arginin specifikus ADPRT enzimként működik (Vogelsang és Aktories, 2006).

4.2.4. Az MTX és a pierisin-1,-2

Az eddig tárgyalt bakteriális toxinok gerincesek sejtjeire ható patogén enzimek. A *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxinja (MTX) szúnyoglárvákat pusztít el. Emlős sejtek nem tudják felvenni (ezért jó ötletnek tűnne emberre veszélytelen szúnyogírtószerként használni, de ilyen irányú gyakorlati felhasználásáról nincs szó az irodalomban). Az MTX katalitikus doménjét sündisznó-formához hasonló szerkezetet kialakítva négy darab autoinhibitor és a rovar bélhámsejteinek felszíni glikolipidjeihez való kötődéshez szükséges,

ricin B-típusú lektin (RBL) doménből álló alegység veszi körbe. Amint a toxin a rovar bélcsatornájába jut, az RBL doméneken lévő dokkoló helyek segítségével kötődik, ezt követően pedig átjut a sejtmembránon. A transzlokáció aktiválja a katalitikus doméneket, így azok ADP-ribozilálni tudják a sejtben eddig még nem azonosított célfehérjét/éket, feltételezhetően Arg oldalláncon (Treiber és mtsai, 2008). Az *E-X-E* motívumot hordozó enzim *in vitro* sejtlyázumokban számos fehérjét arginin specifikusan módosít, pl. *E. coli* sejtlyázumban az Tu elongációs factort (Carpusca és mtsai, 2006). Az enzim N-terminális katalitikus doménje szekvencia homológiát mutat a petrussis toxin S1 alegységével, a CT-A-val és más bakteriális toxinokkal (egyre csökkenő mértékben) (Treiber és mtsai, 2008).

Igen érdekes az MTX nagyfokú hasonlósága a répa- és káposztalepke (*Pieris rapae*, *P. brassicae*), továbbá hozzájuk közeli rokon lepkefajok által termelt pierisin-1 és pierisin-2 nevű enzimekkel, amelyek 91%-ban azonosak egymással (Matsushima-Hibiya és mtsai, 2000). A pierisinek fehérje szubsztrát helyett – eddigi ismereteink szerint az egész

2. Táblázat. Mono-ADP-ribozilációt katalizáló enzimek és szubsztrátjaik eukariótákban
(Corda és Di Girolamo, 2003 és Fieldhouse és Merrill, 2008 alapján, Haigis és mtsai, 2006; Kleine és mtsai, 2012 továbbá Di Paola és mtsai, 2012 adataival módosítva)

ADPRT enzim	Mely élőlény termeli	Szubsztrátja / a módosítás helye	Az ADP-riboziláció hatása
EKTOENZIMEK			
ART1	ember, patkány, egér	integrin, defenzin	gátolja a szubsztrát aktivitását
ART2 (A, B)	patkány, egér	ismeretlen/ Arg	T sejtek proliferációjában fontosak
ART3,-4	ember, patkány, egér	ismeretlen	ismeretlen
ART5	ember	ismeretlen/ Arg	
ART6 (A,B)	házi tyúk	p33, aktin/ Arg18, Arg206	gátolják a szubsztrát aktivitását
ART7	házi tyúk	ismeretlen	
INTRACELLULÁRIS ENZIMEK			
Pierisin-1	répalepke	DNS	citotoxikusak
Pierisin-2	káposztalepke		
Sir2p	élesztő	hisztonok, Sir2p/ acetil-lizin	a hiszton deacetilációban közreműködnek
SirtuinT2	ember	albumin/ acetil-lizin	
SirT4		mitokondriális GDH/ Cys	gátolja

			a szubsztrát aktivitását
ARTD10		poliubiquitin receptor p62 és MYC	ismeretlen
ARTD15		karyopherin β 1/ Ser/Thr (?)	

élővilágban egyedülálló módon – a DNS-ben található 2'-deoxiguaninokat ADP-ribozilálják (Takamura-Enya és mtsai, 2001) (2. Táblázat). A teljes MTX és pierisin-1 (és -2) között csak ~30% az aminosav szekvencia homológia, ami ~50%-ra növekszik, ha csak a katalitikus doméneket hasonlítjuk össze. A pierisin-1 citotoxikus aktivitást mutat a humán carcinoma sejtvonalak ellen A DNS-hez kovalensen köti az ADP-ribózt, ezáltal mutációkat indukál és végül apoptózishoz vezet. Mivel mindkét pierisin főként a lárva stádiumokban van jelen nagyobb mennyiségben és a báb állapot kialakulásakor már lecsökken a mennyisége, ezért azt feltételezik, hogy fertőző vagy parazita szervezetek elleni védekező mechanizmusként lehet szerepe, de az is elképzelhető, hogy apoptotikus hatása révén a differenciálódás és a metamorfózis során feleslegessé vált sejtek eliminálásában van jelentősége.

A pierisinek és az MTX katalitikus doménjében is jelen van az a három konzervált szekvencia motívum, amely az ADPRT-okra jellemző. Az MTX esetében az arginin specifikus ADPRT-ok motívumai vannak jelen. A *Q/E-X-E* motívum ez esetben tehát *E-X-E*. A pierisinek ezzel szemben *Q-X-E* motívumot tartalmaznak, amely a pertussis toxinban (cisztein-specifikus) és C3 *Clostridium botulinum* toxinban (aszparagin-specifikus) is fellelhető. A katalitikus glutaminsav azonos pozícióban található a három fehérjében (Carpusca és mtsai, 2006).

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

Munkacsoportunk először bizonyította ADP-ribozilált fehérjék jelenlétét és az ADPRT aktivitást Gram pozitív baktériumokban, közülük elsőként *Streptomyces griseus*-ban (Barabás és mtsai, 1986), később más *Streptomyces* törzsekben is (*S. lividans*, *S. fradiae*, *S. R61* és *R39*) (Barabás és mtsai, 1988). A *S. griseus*-szal végzett kísérleteikből kiderült, hogy az ADPRT aktivitás korfüggő, a baktérium korai fejlődési stádiumában a legmagasabb. Egy későbbi, a spóráképzés idejével azonos időpontban is megfigyeltek emelkedett ADPRT aktivitást. DNázssal kezelt membránfrakciókban csökkent ADPRT aktivitást találtak, ami a DNS-sel asszociált fehérjék és az ADP-riboziláció közötti összefüggésre engedett következtetni (Barabás és mtsai, 1988).

Vékonyrétegkromatográfiával, agmatint használva ADP-ribóz akzeptorként sikerült kimutatni arginin-specifikus ADP-riboziltranszferáz aktivitást *S. griseus*-ban (Penyige és

mtsai, 1990). A fehérjék ADP-ribozilációjának fiziológiai szerepét vizsgálva specifikus gátlószereket és erre rezisztens mutánsokat használva kimutatták, hogy a *S. griseus*-ban a streptomycin termelését és a sporulációt is befolyásolja az ADP-riboziláció. Az aspecifikus ADPRT inhibitorra, a 3-aminobenzamidra (aba) rezisztens mutáns abban különbözött a vad típusú szülő törzstől, hogy két, ismeretlen funkciójú ADP-ribozilált fehérje (egy 44 kDa-os és egy 72 kDa-os) hiányzott belőle (Ochi és mtsai, 1992).

Az irodalomból ismert volt, hogy a *Rhodospirillum rubrum*-ban a nagy ammónia koncentráció esetén megjelenő, ammónia megkötését katalizáló glutamin szintetáz fehérje ADP-ribozilálódik, de ez nem gátolja az aktivitását (Woehle és mtsai, 1990). Munkacsoportunk kimutatta, hogy *S. griseus*-ban a glutamin szintetáz szintén ADP-ribozilálható *in vitro* és az ADP-riboziláció gátolja az enzim affinitását (Penyige és mtsai, 1994). A *S. griseus* glutamin szintetáza más baktériumokban is ismert módon adenilálható, ami szintén gátolja az enzimaktivitást (Woehle és mtsai, 1990). Az ADP-ribozilációnak a differenciálódásban és spóráképzésben betöltött fontos szerepét támasztották alá azok a *S. griseus* NRRL B-2682 vad típusú törzzsel és a B-2682-3 nem spórázó, NAD-glikohidrolázra mutáns törzzsel kapott eredmények is, amelyeket munkatársaink az ismert növekedést és sporulációt gátló inhibitor, az m-aminofenilboronsav (APBA) hatását vizsgáló kísérletekben kaptak. Kiderült, hogy az APBA kortól és koncentrációtól függően gátolja a *S. griseus* csírázását, növekedését és a sporulációját és eközben az ADP-riboziltranszferáz enzimfehérjékre is gátló hatással van (Penyige és mtsai, 1996).

4.2.5.1. Mono-ADP-riboziláció *Streptomyces coelicolor*-ban

Munkacsoportunk K. Ochi munkacsoportjával együttműködve a *S. coelicolor*-ban kezdte el vizsgálni az ADP-ribozilációt. Létrehoztak benzamid származékokra való rezisztenciáért felelős *brg* génben (korábban *aba*) mutáns *S. coelicolor* törzseket. Azt találták, hogy ezekben megváltozik az ADP-ribozilált fehérjék mintázata. Egy 92 kDa fehérje a légmicélium képzés kezdetekor nem tűnik el, mint azt a vad fenotípus mintázata alapján várhatnánk, hanem változatlanul megmarad. Más fehérjék (39, 41, 43 és 46 kDa-osak) viszont nem jelennek meg ekkor a mutánsban, csak a vad törzsben. Kimutatták, hogy a mutáns *S. coelicolor* actinorhodin termelése és légmicélium képzése is zavart szenvedett. A *brgA* mutációt egy új lokuszra térképezték, az *uraA* közelébe (Shima és mtsai, 1996). A *S. coelicolor* genom megszekvenálása után sem derült még ki, melyik gén szekvenciájával azonos a *brgA* lokusz. Mivel a sejtfal morfológiáját is érintette a mutációja, nem elképzelhetetlen, hogy egy

Mycobacterium smegmatis-ban működő ADPRT enzim (talán az Arr-2) génjének ortológja lehet (Letseka, 2010).

Később a japán kutatók (Sugawara és kollégái) folytatták a *S. coelicolor*-ban zajló endogén ADP-riboziláció élettani jelentőségének vizsgálatát. E célból ciszteinen ADP-ribozilált fehérjéket izoláltak vad típusú *S. coelicolor* 1147 törzsből affinitás kromatográfiás eljárással, 2-D gélelektroforézis és tömegspektrometria felhasználásával négy ADP-ribozilált fehérjét azonosítottak: a MalE-t, BlbKB-t és két periplazmatikus fehérjét (Sugawara és mtsai, 2002). A *BlbKB* a *bldK* génklaszter tagja, amely egy ABC transzporterekhez tartozó oligopeptid permeázt kódol (Nodwell és mtsai, 1996). A *BldK* transzporter felelős a *bld* kaszkádot elindító *bldJ*-függő extracelluláris szignál sejtbe juttatásáért (Chater, 1998). *BldKB* a *BldK* extracelluláris alegysége. A MalE a maltóz felhasználásában fontos (Driessen és mtsai, 2000). A két periplazmatikus fehérje egyike oldott anyagot kötő, a másik pedig elágazó oldalláncú aminosavakat kötő fehérje (vanWezel és mtsai, 1997). Mind a négy fehérje legalább egy (1-3) ciszteint tartalmaz, és mindegyiknek az N terminális végén van egy olyan ciszteinje, amely a lipoproteinekre jellemző szignálszekvencia lipoboxának része. Ez a szignálszekvencia baktériumokban nélkülözhetetlen a lipoproteinek exportjához és a membránon való rögzülésükhöz is (Wu, 1996). Tehát mind a négy azonosított fehérje tápanyagok, anyagcseretermékek membránon keresztül zajló transzportfolyamatában résztvevő, membránhoz kötött lipoprotein. Sugawaraék azt feltételezték, hogy ha a szignálszekvenciában levő Cys oldallánc ADP-ribozilálódik, akkor valószínűleg a fehérje nem szekretálódik és az N-acil-diacilgliceril-ciszteint létrehozó enzim nem módosítja a fehérjét. Az ADP-riboziláció tehát megakadályozhatja a fehérje kijutását a külső membránfelre és azt is, hogy egy lipid molekulán keresztül a membránhoz kötődjön, azaz az ADP-ribozilált, de lipiddel nem módosult fehérje a sejtben marad és nem képes a transzportfolyamatokban ellátni a szerepét (Sugawara és mtsai, 2002).

4.2.5.2. A rifampicint ADP-riboziláló (Arr) enzimek

A *Streptomyces coelicolor* genom megszekvenálása után lehetővé vált a szekvenciahomológiák keresése, ezáltal derült ki a *SCO2860* gén által kódolt fehérjéről, hogy a *Mycobacterium smegmatis*-ban levő Arr fehérjével mutat homológiát, így feltételezhetően ADP-riboziltranszferáz aktivitású enzim (Pallen és mtsai, 2001) (2. Táblázat). Az Arr (más néven ARR) neve abból adódik, hogy ADP-ribozilálja és ezzel inaktíválja a (az USA-ban rifampinként ismert) rifampicint (Dabbs és mtsai, 1995; Quan és mtsai, 1999), amely a

tuberkulózis és multidrog-rezisztens *Staphylococcus aureus* fertőzések kezelésére használt antibiotikum (Ellis és mtsai, 2009). Később Baysarowichéknak sikerült a *S. coelicolor* fehérjét (Arr-sc) és két homológját, a *Mycobacterium smegmatis* Arr-t (Arr-ms) és a *Pseudomonas aeruginosa* Arr-2 fehérjét *E. coli*-ban termeltetni és tisztítani (Baysarowich és mtsai, 2008). A tisztított fehérjék hatékonyan ADP-ribozilálták a rifampicint. Az Arr-ms fehérje széles szubsztrátspecifitást mutatott, számos rifampicin származék ellen okozott rezisztenciát. Lehetséges azonban, hogy a rifampicin elleni rezisztencia csak másodlagos vagy nem várt funkció, és emellett az Arr-ms és homológjai más biológiai szerepet is játszhatnak a sejtben (Baysarowich és mtsai, 2008). Az Arr-ms – érdekes módon függetlenül attól, hogy aktív vagy inaktív enzim formájában van jelen a sejtben – a DNS-ben jelenlévő kettős törések hatására képes a fehérjeszintézisben résztvevő fehérjék és rRNS-ek génjeinek transzkripcióját és a translációját gátolni és képes az RNS-polimeráz β alegységéhez kötődni az L11 riboszómális fehérjén keresztül anélkül, hogy ADP-ribozilálná a fehérjét (Stallings és mtsai, 2011). A *S. coelicolor*-ban működő Arr-sc tehát feltehetően a rifampicintől eltérő molekulákat ADP-ribozilálva vagy más módon még felderítetlen biológiai funkciót láthat el.

A SigB polipeptid a fő stressz indukálta szigma faktor az *Actinobacteria* törzsben, így a *S. coelicolor*-ban is (Cho és mtsai, 2001). A szigma faktor B génjében mutáns *M. smegmatis* DNS-ében bekövetkező kettős törések esetén az *arr* gén expressziója lecsökkent, ami arra enged következtetni, hogy az *arr* gén a baktériumot ért stressz túlélésében is szerepet játszhat (Mukherjee és Chatterji, 2005).

Mindezen eredményeket összegezve sok adat gyűlt már össze arról, hogy az ADP-riboziláció jelentős szerepet játszhat a *Streptomyces*-ek fejlődésében és differenciálódásában. A sokféle ADP-ribozilált fehérje jelenléte arra utal, hogy valószínűleg több ADPRT enzim is működik a *Streptomyces* sejtekben (bár eddig csak egyet azonosítottak közülük, az Arr-t, amelynek még nem pontosan tisztázott a funkciója), és az általuk módosított fehérjékről is nagyon limitált a tudásunk.

5. CÉLKITŰZÉSEK

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

Munkánk során ezért célul tűztük ki

- 1) az optimális reakció feltételek beállítását a *S. coelicolor* tenyészet sejtkivonatában levő fehérjék *in vitro* ADP-ribosilálásához.
- 2) a vad típusú törzsben található ADP-ribosilált 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-ribosilált fehérjék mintázatának összehasonlításával kívántuk elvégezni.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1 Anyagok

6.1.1. Vegyszerek

A kísérleteinkben a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb tisztaságú vegyszereket használtuk, még a táptalaj összetevők esetében is. Ez alól kivételt képez a szójaliszt és a csapvíz az SFM táptalajban. A vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich Kft-től szereztük be. A továbbiakban az ettől eltérő beszerzésű anyagokat sorolom fel. *Bio-Rad*: agaróz, stripek (immobilizált pH-grádiens csíkok), a ReadyPrep™ 2-D-Cleanup kit, a IPG pufferek és a 2-D-gélelektroforézishez szükséges vegyszerek. *Fermentas*: Pfu polimeráz, dNTP készlet, 100 bp létra, restrikciós enzimek: *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *Invitrogen*: 1 kbp létra. *ICN Pharmaceuticals Corp. Biochemical*: [adenin-2,8-(³H)]NAD⁺ (1,11×10¹² Bq/mmol (30 Ci/mmol). *Millipore*: Centricon (Ultracell YM-3000; 3 kDa molekulatömeg kizárású) szűrőegységek YM-3 (3 kDa molekulatömeg kizárású) Amicon ultrafiltrációs membránnal, nitrocellulóz membrán filter (0.45 µm pórusátmérő), *Molecular Probes*: propídium-jodid. *PerkinElmer*: Aqasol. *Promega*: T4 DNS ligáz, proteináz K, restrikciós enzimek: *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*. *Pierce*: Coomassie Protein Assay reagens. *Qiagen*: QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló készlet, MinElute PCR Purification kit, QIAquick gélextrakciós kit. *Spektrum 3D*: tris-hidroxil-aminometán (TRIS), triklór-esetsav (TCA). *Reanal*: etilén-diamin tetraecetsav (EDTA), dimetil-szulfoxid (DMSO). *Merck*: β-merkapto-etanol (ME).

6.1.2. Pufferek, oldatok

DNS munkához szükséges oldatok:

1×TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8,0

50×TAE puffer: 2mM Tris-acetát, 50 mM EDTA, pH=8,0

A DNS gélelektroforéziséhez használt puffer 1xTAE.

10×PBS: 35,6 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát, 61,5 g/l NaCl

Propídium jodid oldat: 50 µg/ml propídium-jodid PBS-ben feloldva

Streptomyces genomi DNS izoláláshoz szükséges oldat:

Lízis oldat: 25 mM Tris-HCl (pH=7,5), 25 mM EDTA, 0,3 M szacharóz, 2 U RNáz
Plazmid miniprep („alkalikus lízis” módszerrel) készítésekor felhasznált oldatok:

TEG oldat: 25 mM Tris-HCl pH=(8,0), 10 mM EDTA, 50 mM glükóz

alkalikus SDS oldat: 200 mM NaOH, 1 SDS

kálium-acetát oldat: 3 M KAc, 2 M tömény ecetsav, pH=4,9

Cosmid DNS izoláláshoz szükséges oldatok:

I. oldat: 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA

II. oldat: ugyanaz, mint az alkalikus SDS oldat

III. oldat: 3 M KAc (pH=5,5)

E. coli és Streptomyces törzsek tenyésztéséhez, fenntartásához és transzformálásához

szükséges oldatok:

Antibiotikum törzsoldatok: chloramfenicol (25 mg/ml, etanolban oldva), ampicillin (50 mg/ml), apramycin (50 mg/ml); kanamycin (50 mg/ml); thiostrepton (50 mg/ml); nalidixinsav (25 mg/ml, 0,3 M NaOH oldatban)

Spórakonzerváló oldat: 0,9% NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH=7,2), 0,001% Triton X-100

P (protoplaszt) puffer: (Bemérések 800 ml-hez), 0,25 g K₂SO₄, 2,02 g MgCl₂ × 6H₂O, 103 g szacharóz, 2 ml nyomelem oldat. A felhasználás napján 80 ml puffer az autoklávozást követően kiegészítendő az alábbi steril oldatokkal: 1 ml KH₂PO₄ (0,5%), 10 ml CaCl₂ × 2H₂O (3,68%), 10 ml TES puffer (5,73%, pH=7,2). A nyomelem oldat azonos az R5 táptalajnál ismertetett oldattal.

Fehérje munkákhoz használt oldatok:

Rehidráló puffer (IEF puffer, minta puffer): 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0,2% 3/10 IPG puffer, 50 mM DTT, 0,002% brómfenolkék

ADP-riboszilációs puffer: 25 mM MOPS (pH=7,4), 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1,3 µl/ml proteáz inhibitor koktél (P8465, Sigma-Aldrich)

„A” puffer: 20 mM HEPES (pH=8,6), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.005% SDS, 500 mM urea

1× 2-D futtató puffer (pH=8,2): 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicin, 1% SDS

Blue Silver festőoldat (Bemérések 600ml-hez) 0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,72 g), 10% ammónium-szulfát (60 g), 10% foszforsav (60 ml), 20% metanol (120 ml).

Barna üvegben tárolandó. Fehérje-elektroforézis során kapott gél festéséhez használjuk.

(Ha szükséges, akkor a differenciálás desztillált vízben (dH₂O) történik.)

CBB R-250 festőoldat: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% metanol, 7% ecetsav
Fehérje-elektroforézis során kapott gél festéséhez használjuk, az előhívás a szintén 40% metanolt és 7% ecetsavat tartalmazó differenciáló oldattal történik.

Equilibráló puffer I: 6 M urea, 2% SDS, 0,357 M Tris-HCl (pH=8,8), 30% glicerol, 1% DTT

Equilibráló puffer II: 6 M urea, 2% SDS, 0,357 M Tris-HCl (pH=8,8), 30% glicerol, 2,5% jódiacetamid. Az equilibráló pufferekhez a DTT-t és a jódiacetamidot mindig frissen, közvetlenül a felhasználás előtt mérjük hozzá. Mindkét puffert a 2-D gélelektroforézisnél alkalmazott stripek equilibrálásához használjuk.

10×AA Futtató puffer akrilamid gélhez: 3 g/l Tris, 14,2 g/l glicin, 1 g/l SDS, (1 l dH₂O-ben feloldva). Akrilamid gélen történő futtatáshoz használjuk (1×AA).

Fehérje minta puffer: 50 mM Tris-HCl, (pH 6,8) (50 ml), 1% SDS (100 ml), 15% glicerol (150 ml), 1% β-merkaptoetanol (10 ml), 0,05% brómfenolkék (0,5 g), ultra tiszta víz (690 ml). Ebben a pufferben vesszük fel a fehérje mintákat SDS-PAGE analízis előtt.

TCA törzsoldat: 5 g TCA 3,5 ml dH₂O-ben feloldva. Fehérjék kicsapásához használjuk.

I. anód puffer: 10% metanol, 0,3 M Tris (pH 10,4) Blottoláshoz használjuk.

II. anód puffer: 10% metanol, 25 mM Tris (pH 10,4)

Katód puffer: 10% metanol, 95,9 mM glicin, 62,3 mM Tris (pH 9,4)

6.1.3. Baktérium törzsek

Streptomyces törzsek:

<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145 (vad típusú törzs)	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ (Hopwood és mtsai, 1985)
<i>S. coelicolor</i> M145 ΔSCO5461::apr (mutáns törzs)	ΔSCO5461, a gén helyén apra-oriT kazetta (jelen munka)
<i>S. coelicolor</i> M145 ΔSCO5461::apr/pWH1 (komplementált mutáns törzs)	a ΔSCO5461 mutációt komple- mentálja a pWH1 plazmidon be- juttatott SCO5461 gén (jelen munka)

E. coli törzsek:

DH5α /pIJ773	plazmid: pBluescript KS(+) aac(3)IV oriT(RK2) FRT helyek kromoszóma: supE44 ΔlacU169(Φ80 lacZM15 hsdR17 recA1
--------------	--

	endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (ReDirect)
BW25113/pIJ790	plazmid: pIJ790 [<i>oriR101</i>] [<i>repA101(ts)</i>] <i>araBp-gam-bet-exo</i> kromoszóma: (Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-4</i>) <i>lacI</i> 4000 (<i>lacI</i> ^Q) λ^- <i>rpoS</i> 369(Am) <i>rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsdR</i> 514 (Datsenko és Wanner, 2000)
ET12567/pUZ8002	plazmid: <i>oriT</i> tarlamú RK2 (Kieser és mtsai, 2000) kromoszóma: <i>dam</i> 13::Tn9 <i>dcm</i> 6 <i>hsdM</i> <i>hsdR</i> <i>zjj</i> 201::Tn10 <i>galT</i> 22 <i>ara</i> 14 <i>lacY</i> 1 <i>xyl</i> 5 <i>leuB</i> 6 <i>thi</i> 1 <i>tonA</i> <i>rpsL</i> 136 <i>hisG</i> 4 <i>tsx</i> 78 mtli <i>glnV</i> 44 F ⁻ (ReDirect)
HB101	Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB</i> 6 <i>supE</i> 44 <i>ara-14</i> <i>galk</i> K2 <i>lacY</i> 1 <i>rpsL</i> 20 (Strr) <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i> <i>recA</i> 13(4) F ⁻

A HB101 törzset a BioRad-tól vásároltuk, a többi törzs a John Innes Centre (Norwich, UK) törzsgyűjteményéből származik.

6.1.4. Táptalajok, tápoldatok

A táptalajok hozzávalóinak mennyisége 1 literre vonatkozik. Általában desztillált víz az oldószer, az ettől eltérő víz fajtáját a recept tartalmazza. 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.

Streptomyces törzsekhez használt táptalajok:

R5 (R2YE): 103 g /l szacharóz, 0,25 g /l K₂SO₄, 10,12 g/l MgCl₂·6H₂O, 10 g /l glükóz, 0,1 g/l Difco casaminosav, 2 ml/l Nyomelem oldat, 5 g/l Difco élesztő kivonat, 5,73 g/l TES puffer
Felhasználás előtt a 2,2 g agar tartalmú 100 ml táptalajt az alábbi komponensekkel kell kiegészíteni: 1 ml KH₂PO₄ (0,5%), 0,4 ml CaCl₂·2H₂O (5 M), 1,5 ml L-prolin (20%), 0,7 ml NaOH (1N).

Nyomelem oldat: 40 mg/l ZnCl₂, 200 mg /l FeCl₃ x 6H₂O, 10 mg/l CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg/l MnCl₂ x 4H₂O, 10mg/l Na₂B₄O₇ x 10H₂O, 10 mg/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O

SFM (Mannitol Soya flour Medium, MS) (Hobbs és mtsai, 1998): 20 g mannit, 20 g szója-liszt, 1000 ml csapvíz.

Az elkészítéséhez megfelelő az élelmiszer boltokban beszerezhető szójaliszt minősége.

Szilárd táptalaj esetén 2% agarral egészítettük ki a sterilizálás előtt.

SMM (Supplemented Minimal liquid Medium): 2 g Difco casamino acid, 5,73 g TES puffer, 1000 ml ioncserélt víz (pH=7)

SMMS: Felhasználás előtt a 3 g agar tartalmú 200 ml SMM táptalajt az alábbi steril komponensekkel kell kiegészíteni: 2 ml 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 1 ml 1 M MgSO_4 , 3,6 ml 50%-os glükóz oldat, 0,2 ml Nyomelem oldat (ugyanaz, mint az R5 táptalajnál).

SMMS+10% szacharóz: 200 ml SMM táptalajhoz 3 g agar mellett 20 g szacharózt is adtunk, a továbbiakban a fenti receptet követtük.

YEME (Yeast extract-malt extract): 3 g/l Difco élesztő kivonat, 5 g/l Difco Bacto-pepton, 3 g/l Oxoid maláta kivonat, 10 g/l glükóz, 340 g/l szacharóz.

Autoklávozás után 1 litert 2 ml 2,5 M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ oldattal kell kiegészíteni (5 mM végkoncentráció), protoplaszt készítése-kor 0,5% végkoncentráció eléréséhez 20%-os glicin oldattal kell kiegészíteni (25 ml-t adni 1 literhez).

Komplementálásnál a *Streptomyces* transzformálásakor használtuk ezt a táptalajt.

YMG (Yeast extract-malt extract-glucose):

4 g/l élesztő kivonat, 10 g/l maláta kivonat, 4 g/l glükóz.

A Nicodinovic-féle *Streptomyces* genomi DNS izoláláshoz használtuk.

2 x YT: 16 g/l Tripton, 10 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl.

A *Streptomyces* spórák konjugálást megelőző mosásához használtuk.

E. coli törzsek tenyésztéséhez használt táptalajok:

LB (Lennox Broth) - folyékony táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl, 1 g/l glükóz. A pH-t NaOH oldattal 7,5-re állítjuk.

LB (Lennox Broth) agar: 100 ml LB-hez 1,5 g agart adunk.

SOB (Super Optimal broth) (Hanahan, 1983): 20 g/l tripton (2%), 5 g élesztő kivonat (0,5%), 5 g NaCl (0,05%), 0,0186 g KCl (2,5%).

A pH-t NaOH oldattal 7-re állítjuk. A sterilizálás után lehűlő (kb. 55°C-os) oldatot kiegészítjük 10 ml steril 1 M MgCl_2 oldattal és a megfelelő antibiotikummal. 4°C-on tárolva kb. 1-2 hétig stabil a táptalaj.

SOC (Super Optimal broth with Catabolite): Felhasználás előtt 10 ml SOB táptalajhoz 0,2 ml steril 1 M glükóz oldatot adunk.

6.1.5. Vektorok

pWHM3 plazmid: A pUC19 és a pIJ486 plazmid replikációs origóját, kék-fehér szelekciót lehetővé tevő lacZ promotert, lacZ gént, ampicillin és thiostrepton rezisztencia géneket tartalmaz. Magas kópiaszámú *E. coli* / *Streptomyces* ingázó vektor. *Streptomyces*-ekben 100 példány jut egy kromoszómára (Vara és mtsai, 1989).

St3D11 cosmid: A *SCO5461* gént (pozíciója a kromoszómán: 5948080-5948694) magába foglaló 43364 bp *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomi DNS szakaszt (5924481-5967844) és kanamycin rezisztencia gént tartalmaz (Redenbach és mtsai, 1996).

Az összes vektort a John Innes Centre (Norwich, UK) biztosította számunkra.

6.1.6. Oligonukleotid primerek

A ReDirect technika első lépésében (6.2.3.1.) az alábbi primerekkel hoztuk létre a *SCO5461* génre specifikus végekkel rendelkező kazettát:

5461F 5'-CGG-AAT-GCG-TCG-CTC-CGC-GGC-CGG-GAT-CGT-ATC-CGC-ATG-att-ccg-ggg-atc-cgt-cga-cc-3'

5461R 5'-CGC-TGT-TCC-TGC-GCC-CCT-GAG-CCA-GGA-CGG-CCG-GTG-TCA-tgt-agg-ctg-gag-ctg-ctt-c-3'

A *SCO5461* gén megszakításának bizonyításához (6.2.3.4.) az alábbi primerpárt alkalmaztuk:

Str1F 5'-GCC-ACC-TAC-GGG-TGA-GAA-T-3'

Str2R 5'-GGA-CGA-GGG-ATG-GGT-ACG-3'

A ReDirect technikával létrehozott *S. coelicolor* M145 Δ *SCO5461::apr* törzs komplementálásához szükséges teljes *SCO5461* gént PCR-rel szaporítottuk fel (6.2.4.) a következő primereket felhasználva:

5461HindStartF 5'-CAG-GAA-GCT-TGC-ATG-ATC-CAA-CCA-CTA-GTC-TG-3'

5461EcoStopR 5'-CAA-TGA-ATT-CGT-CAG-TGC-CAG-GGC-TGG-TAG-3'

F-fel jelöltük a forward (sense) oligonukleotidokat, R-rel a reverz (antisense) oligonukleotidokat. Vastag betűvel kiemeltük a transzlációs start és stop kodonokat. Aláhúzással jelöltünk a restrikciós enzim felismerőhelyeket, amelyeket a primerek célszekvenciájával együtt a felhasználásuknál ismertetünk.

6.2. Módszerek

6.2.1. Tenyésztési körülmények

Escherichia coli törzsek tenyésztése:

Az *E. coli* DH5 α /pIJ773, a BW25113/pIJ790 és az ET12567/pUZ8002 törzsek tenyésztése a ReDirect technika részletes ismertetésében olvasható (6.2.3.).

A komplementálási kísérlethez használt HB101 törzset egy telepről leoltva egy éjszakán át 37°C-on növesztettük LB folyékony táptalajban, 200 rpm-mel rázógépből rázatva, papírdugóval bedugaszolt Erlenmeyer lombikokban.

Streptomyces törzsek tenyésztése:

A *S. coelicolor* törzsek tenyésztése minden esetben 30°C-on történt. A szilárd tenyészeteket termosztátban növesztettük, a folyékony táptalajban esetén 240 rpm-mel ráztuk a tenyészetet. A tenyésztési körülmények különbségei egyrészt a táptalajválasztásban mutatkoztak meg, másrészt a spórákat vagy csupasz táptalajfelületre, vagy az erre borított celofánra illetve Millipore szűrőpapírra (Paraplan nitrocellulóz, 0,2 μ m) szélesztettük platinakacs segítségével.

Spóraszuszpenzió készítéséhez törzstől függően a megfelelő antibiotikummal kiegészített SFM táptalajra szélesztettük a spórákat. Egy spóraszuszpenzió elkészítéséhez 3 Petri csészére elegendő leoltani.

Az ADP-riboszilált fehérjék vizsgálatánál szükséges sejtkivonat készítéséhez a *S. coelicolor* A3(2) M145, vad típusú, prototróf, antibiotikum termelő törzs tömény spóraszuszpenziójából lemezenként $\sim 6 \times 10^7$ spórát celofánnal borított SFM-agar táptalajra szélesztettünk, majd 30°C-on, 36 órán keresztül növesztettük. A celofán átengedte a tápanyagokat és megakadályozta a hifák táptalajba hatolását, ezzel lehetővé tette azt, hogy a teljes micéliumtömeget el tudjuk távolítani a táptalajról.

A konjugáláshoz felhasznált *S. coelicolor* A3(2) M145 és a konjugálás után létrejött mutáns törzs tenyésztése a ReDirect technika részletes ismertetésében olvasható.

A komplementáláshoz YEME táptalajon növesztettük fel a vad típusú törzset.

A micéliumok fáziskontraszt és konfokális mikroszkópos vizsgálatához a kész, Petri csészékbe öntött (apramycint tartalmazó és antibiotikum mentes SMMS, SMMS+10% szacharóz, R5 táptalajokba előzőleg 70%-os etanolban áztatott, majd szárított steril üveg

fedőlemezeket állítottunk ~40°-os dőlésszöggel. A táptalaj-fedőlemez érintkezéséhez spóra szuszpenziót fecskendeztünk, majd 30°C-on a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatokhoz 3, 4, 5, 7 és 12 napig, a konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz 2 napig és 1 hétig növesztettük.

Az antibiotikum termelés vizsgálatához a szilárd SMMS, SMMS+10% szacharóz és R5 táptalaj felületére, a Petri csésze közepére steril filtert (Paraplan nitrocellulóz, 0,2 µm, Millipore) helyeztünk és csak arra szélesztettünk *S. coelicolor* M145 és Δ SCO5461::*apr* mutáns spórákat, hogy egy hét elteltével a kinőtt micélium a papírral együtt teljességgel eltávolítható legyen.

Spóra szuszpenzió készítése:

Az összes, általunk használt *Streptomyces* törzset 3-3 Petri csészében, SFM táptalajon 30°C-on növesztettük. Az egy hetes tenyészetekről a spórákat steril üveggyöngyökkel ráztuk le, majd steril fiziológiás sóoldattal lemostuk, a gyöngyöket is (máskor pedig steril vattacsomóval simogattuk le óvatosan a felületről), majd összegyűjtöttük az összes folyadékot a lemez felszínéről. A spórákat steril vattacsomón átszűrve mentesítettük az esetleges nagyobb micélium törmelékektől. Centrifugálással (3000 × g, 15 perc, 4°C) eltávolítottuk a vizet, majd steril spórakonzerváló oldattal elegyítettük a spórákat. A kapott spóra szuszpenziót -20°C-on tároltuk, és a felhasználáshoz úgy hígítottuk meg, hogy kb. 10⁷/ml spóraszámot kapjunk.

6.2.2. ADP-ribozilált fehérjék vizsgálata

Két különböző célból izoláltuk az ADP-ribozilált fehérjét. Az egyik cél a vad fenotípusú *S. coelicolor* M145 törzsben található endogén ADPRT enzimek által ADP-ribozilált fehérjék azonosítása volt, MALDI-TOF tömegspektrometriás analízissel. A másik cél pedig annak bizonyítása volt, hogy a SCO5461 fehérje valóban ADPRT.

6.2.2.1. Sejtkivonat készítése

A törzseket celofánnal borított táptalajra oltottuk le, 30°C-on növesztettük, majd közvetlenül a légmicélium képzés kezdete előtt lekapartuk a micéliumot.

1.) A MALDI-TOF analízisben felhasznált fehérjék SFM táptalajon, 36 órán keresztül növesztett M145 törzsből származtak. 2.) A vad, a mutáns és a komplementált mutáns törzs ADP-ribozilált fehérje-mintázatának összehasonlítása a vad törzs antibiotikum mentes, a többi

törzs apramycin tartalmú R5 táptalajon növesztett 32 órás tenyészetéből készült sejtkivonathoz történő felhasználásával történt. A micéliumot lekapartuk a celofánról és azonnal jéghideg ADP-ribozilációs pufferben szuszpendáltuk. Ezt követően a micéliumokat ultrahanggal (Bronson Sonifier 250) feltártuk 2 percig, 50%-os ciklusokkal, a csövet közben jeges vízbe állítva. A sejttörmelékcentrifugálással ($30000 \times g$, 20 perc, 4°C) eltávolítottuk és a tiszta felülúszót (a citoplazmakivonatot) használtuk fel a sejtfehérjék további vizsgálatához.

6.2.2.2. ADP-ribozilációs reakciók

Az ADP-ribozilációs reakció optimalizálása [adenin-2,8- ^3H]NAD $^{+}$ szubsztrát használatával:

A kísérletben SFM agaron nőtt, éppen a légmicélium képzés előtt álló *S. coelicolor* M145 vegetatív micéliumból készült sejtkivonatot használtunk. A minta egyik feléhez $500 \mu\text{M}$ ADP-ribózt, míg a másik feléhez azonos mennyiségben desztillált vizet adtunk, majd párhuzamosan 3-3 csőben 3-3 ml mintával dolgoztunk tovább. A reakciót $100 \mu\text{M}$ [adenine-2,8- ^3H]NAD $^{+}$ ($0.25 \mu\text{Ci}$) hozzáadásával indítottuk el és 30°C -on inkubáltuk a csöveket. 5 perc után, ezt követően pedig 10 percenként $100\text{--}100 \mu\text{l}$ -es mintákat vettünk mind a hat csőből, ezek fehérjetartalmát kicsaptuk 20% triklór-ecetsavval (TCA) 0°C -on, 30 perc alatt. A kicsapott fehérjét nitrocellulóz membrán filteren (Millipore HA; $0,45 \mu\text{m}$ pórusátmérő) átszűrtük. A filtert alaposan átmostuk 5%-os jéghideg TCA-val, végül pedig 96%-os etanollal. A filtereken maradt radioaktív jelet folyadék szcintillációs módszerrel (PerkinElmer Liquid Scintillation Analyzer 2800 TR) mértük. A minták fehérje tartalmát Bradford reagenssel (Sigma-Aldrich) határoztuk meg a gyártó utasításai alapján. Minden mintavételi időpontban párhuzamosan 3-3 mérést végeztünk, ezek eredményének átlagát ábrázoltuk. Az ADPRT aktivitást a savval kicsapott anyagba beépült radioaktivitás (d.p.m) $\times$ a fehérje tartalom (mg-ban kifejezve)/perc értékével fejeztük ki.

ADP-ribozilációs reakció a MALDI TOF analízishez:

36 órás, SFM táptalajon, celofánon növesztett, éppen a légmicélium képzés előtt álló *S. coelicolor* M145 törzs vegetatív micéliumból készítettünk sejtkivonatot a 6.2.2.1. pontban írtak szerint, annyi módosítással, hogy a centrifugálást $35000 \times g$ -vel, 30 percig, 4°C -on végeztük. 30 lemezről gyűjtöttünk micéliumot. A sejtkivonat $8,9 \text{ mg/ml}$ fehérjét tartalmazott. 25 ml sejtkivonatot 30 percig 30°C -on síkrázógéppel mozgatva (50 rpm -mel) előinkubáltunk,

majd 500 μM ADP-ribózt adtunk hozzá. Ezt követően kettéosztottuk a mintát: az egyik feléhez 200 μM NAD^+ -ot, míg a másikhoz azonos mennyiségű dH_2O -t adtunk, majd folytattuk további 30 percig 30°C -on az inkubálást. Az ADP-riboziláció megállítása érdekében mindkét minta fehérjét 112,5 ml jéghideg acetonnal kicsaptuk és a kicsapott fehérjét egy éjszakán át -20°C -on tároltuk.

ADP-ribozilációs reakció β [adenil- ^{32}P]NAD $^+$ -dal a vad-, mutáns- és komplementált mutáns törzsek ADP-ribozilációs mintázatának összehasonlításához:

A *S. coelicolor* M145 vad típusú törzset, a *S. coelicolor* M145 $\Delta\text{SCO5461}::\text{apr}$ mutáns törzset és a *S. coelicolor* M145 $\Delta\text{SCO5461}::\text{apr/pWH1}$ celofánnal borított (a mutánst apramycin tartalmú) R5 táptalajon növesztettük fel, majd 6.2.2.1. pontban írtak szerint a 32 órás micéliumokból kiindulva sejtkivonatokat készítettünk. A citoplazmakivonatokhoz 25 μM ADP-ribózt adtunk. A reakciót 10 μM β [adenil- ^{32}P]NAD $^+$ ($1,85 \times 10^6$ Bq/100 μl minta) hozzáadásával indítottuk el és 30°C -on 30 percig inkubáltuk a csöveket, majd 100 μl jéghideg 20%(w/v) triklór-ecetsavval (TCA) kicsaptuk a fehérjét 0°C -on, 30 perc alatt. A kicsapott fehérjét centrifugálással ($12000 \times g$, 5 perc, 4°C) összegyűjtöttük. A csapadékot átmostuk 10%(w/v)-os jéghideg TCA-val, végül pedig dietil-éterrel kétszer. A fehérjét egész éjszaka 4°C -on inkubálva 5 μl 5% (w/v) SDS oldattal kiegészített 40 μl $2\times$ töménységű elektroforézis minta pufferben visszaoldottuk. A SDS-PAGE gélelektroforézist megelőzően a mintát 90°C -on 5 percig melegítettük.

6.2.2.3. ADP-ribozilált fehérjék tisztítása m-aminofenilboronsav-agaróz affinitás kromatográfiás módszerrel

A jéghideg acetonnal kicsapott, aztán egy éjszakán át -20°C -on tárolt, a 6.2.2.2. pontban leírtak szerint ADP-ribozilált fehérjék tisztításához m-aminofenilboronsav-agaróz affinitás kromatográfiás módszert használtunk (Bisse és Wieland, 1992; Jobs és mtsai, 1992). A kicsapást követő napon centrifugálással ($10000 \times g$ -vel, 10 perc, 4°C) összegyűjtöttük a fehérjét. SDS és urea tartalmú „A” pufferrel oldottuk vissza az üledéket. A NAD^+ -dal kezelt és a kezeletlen mintából származó fehérjeoldatokat m-aminofenilboronsav-agaróz kovalens kromatográfiás oszlopon tisztítottuk. Az oszlopot SDS és urea mentes „A” pufferrel mostuk addig, amíg az átfolyóban már nem volt fehérje. Az oszlop specifikusan köti a vicinális diolokat tartalmazó molekulákat, így az ADP-ribózt és az ADP-ribozilált fehérjét

is. A glikozilált fehérjéket is meg tudja kötni az oszlop, ha jelen vannak a mintában. A felkötődött fehérjéket detergens nélküli, 200 mM szorbit tartalmú „A” pufferrel eluáltuk az oszlopról. A fehérje tartalmú frakciók összegyűjtése után a minta ultraszűrését YM-3 (3 kDa molekulatömeg kizárású) Amicon ultrafiltrációs membránnal (Millipore, Bedford, USA) végeztük 2 atmoszféra nyomású nitrogén gázzal, 4°C-on, állandó kevertetés mellett. A mintát tovább töményítettük Centricon (Ultracell YM-3000; 3 kDa molekulatömeg kizárású) szűrőegységekben (Millipore, Bedford, USA) történt 6500 × g-s centrifugálással. A kezeletlen kontroll fehérjeit ugyanilyen lépéseken keresztül tisztítottuk, majd töményítettük.

6.2.2.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjeminták futtatásához használt poliakrilamid gél akrilamid (29,1%) és a N,N'-metilén-bis-akrilamid (0,9%) kopolimerje, amely megfelelő monomer egységekből szabad gyökök hatására keletkezik. A képződő szabadgyököket ammónium-perszulfát (APS) adja és N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) stabilizálja. A polimerizáció oxigéntől elzártan, szobahőmérsékleten játszódik le.

Kísérleteink során a Laemmli-féle, azaz nem folytonos (diszkontinuus) pufferrendszert alkalmaztuk. A gél összetétele a következő:

13%-os szeparáló (alsó) gél: 0,1% SDS, 0,1% ammónium-perszulfát, 0,05% TEMED, 375 mM tris(hidroximetil)amino metán (Tris) pH=8,8, 13% akrilamid törzsoldat

5%-os tömörítő (felső) gél: 0,1% SDS, 0,1% ammónium-perszulfát, 0,1% TEMED, 125 mM tris(hidroximetil)amino metán (Tris) pH=6,8, 5% akrilamid törzsoldat

A futtatás állandó 200 V-os feszültség mellett kb. 50 percig tartott.

Az egydimenziós SDS-PAGE esetén a fehérjesávok molekulatömegének meghatározására a HIGH MOLECULAR WEIGHT STANDARD MIXTURE (Sigma) molekulatömeg-markert használtuk (6500-200000 Da) gélek festése Coomassie Brilliant Blue R-250 (Blue Silver, koloidális Coomassie) festőoldattal történt.

6.2.2.5. A radioaktív fehérjék blottolása és radiogramm készítése

Az SDS-PAGE elválasztást követően a gélét Immobilon P (Millipore, PVDF típusú, 1,45 µm pórusméretű) transzfer membránra blottoltuk (semi-dry módszerrel). Ehhez előbb a transzfer membránt metanollal mostuk, majd rehidráltuk dH₂O-ben, végül II. anód pufferrel equilibráltuk. Az anód elektród lemezére két réteg, I. anód pufferrel nedvesített Whatman

szűrőpapírt, rá egy II. anód pufferrel nedvesített szűrőpapírt majd az Immobilon P membránt helyeztük. Erre került a gél majd három rétegnyi, katód pufferrel benedvesített Whatman szűrőpapír, végül a katód lemeze. A blottolást $2,1 \text{ mA/cm}^2$ feszültséggel 1 órán keresztül végeztük. A blottot levegőn hagytuk száradni, majd kazettába tettük és egy éjszakás exponálás után MolecularDynamics PhosphorImager SI készülék segítségével detektáltuk a radioaktív fehérjéket.

6.2.2.6. Fehérjék szeparálása 2-D-gélen

A 2-D gélelektroforézis során a fehérjéket molekulatömegük és izoelektromos pontjuk szerint is elválasztjuk, így jobb felbontást kapunk a géleken.

A mintákat először olyan, előre gyártott műanyag csíkokra polimerizált akrilamid gélekre, ún. stripekre vittük fel, amelyekben amfolittal pH gradienst alakítottak ki az előállítás során. Ezt követően a mintákat izoelektromosan fókuszáltuk. Ennek során a fehérjék izoelektromos pontjuk szerint váltak el egymástól.

Ezután a stripeket equilibráltuk, majd SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, ahol a már izoelektromos pontjuk szerint szétválasztott fehérjék molekulatömegüknek megfelelően vándoroltak. A 2-D elektroforézis esetén nincs lehetőség molekulatömeg-marker alkalmazására.

Fehérjetisztítás 2-D gélelektroforézishez:

100 μl betöményített fehérjemintát (80 μg fehérje/minta) ReadyPrep™ 2-D Cleanup kittel (Bio-Rad Laboratories) a gyártó utasításai szerint kicsaptunk és sómentesítettünk, majd 125 μl rehidrációs [IEF (isoelectric focusing) vagy minta] pufferben oldottuk fel.

A stripek rehidrálása:

A tisztított és megfelelő térfogatú minta pufferben felvett (kb. 125 μl /minta) mintákat egy rehidráló tálca egy-egy mélyedésébe pipettáztuk, ezután a -20°C -ről nem sokkal előbb kivett 7 cm-es, pH=3-10 vagy 4-7 IPG stripekről (immobilizált pH gradiens csíkokról) csipesz segítségével lehúztuk a védőfóliát, majd a vályúkba hasaltattuk. 1,5 ml olajat (Biorad) mértünk minden stripe-re, hogy ne száradjanak ki. 16 órán keresztül szobahőn állni hagytuk, hogy az IPG csíkokon található vékony akrilamid gélréteg magába szívja a mintát.

Izoelektromos fókuszálás (IEF):

Miután az IPG stripek megduzzadtak, az olaj leitatása után géllal lefelé áthelyeztük őket a fókuszáló tálcára. Minden strip alá bidesztillált ultra tiszta vízzel átitatott szűrőpapírcsíkot helyeztünk az elektródokra, a kiszáradás elkerülése érdekében 1,5 ml olajat pipettáztunk a stripekre. A fókuszáló tálcát így helyeztük a Protean IEF Cell (Biorad) készülékbe és elindítottuk a fókuszálást.

Az izoelektromos fókuszálás feszültség gradiense 20°C-on:

- 0-250 V, 20 perc (egyenletes feszültség emelés)
- 250-4000 V, 2 óra (egyenletes feszültség emelés)
- ezután 4000 V-on 10000 Vh (Volt óra) (gyors feszültség emelés)

A stripek equilibrálása:

Az IEF-t követően a stripekről leittattuk az olajréteget nedves szűrőpapír segítségével, majd a géleket egy rehidrááló tálca egy-egy mélyedésébe helyeztük át úgy, hogy az akrilamid réteg felfelé nézzen. (Így lefedve és fóliába csomagolva -80°C-on tárolhatjuk a felhasználásig.) Ezután 10-10 perc erejéig 2,5-2,5 ml equilibráló puffer I-t, majd equilibráló puffer II-t mértünk rájuk.

A 2-D gél futtatása:

A stripeket a géltre helyezés előtt egyenként 1×TRIS-glicin elektród puffer 2-D futtató pufferbe merítettük/áztattuk. Eközben felmelegített fedőagarózból (0,5% alacsony olvadáspontú agaróz oldva 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS és nyomnyi Bromofenol kék elegyében) 1-1 ml-t pipettáztunk az akrilamid gél tetejére, és ebbe helyeztük a stripeket. Miután az agaróz megszilárdult, a gél futtatását a Mini-Protean 2-D Cell (Bio-Rad Laboratories) készülékben elindítottuk. A SDS-PAGE-részben (6.2.2.4.) leírtak szerint Laemmli-féle pufferrendszert, 13%-os szeparáló gél és 5%-os tömörítő gél alkalmaztunk. A futtatást állandó 200 V-os feszültséggel, hűtés mellett kiviteleztek. Három, egymástól függetlenül izolált fehérje mintát szeparáltunk 2-D gélen, hogy az ADP-riboszilált fehérjék reprezentatív mintázatát kapjuk eredményül.

6.2.2.7. A fehérjefoltok tömegspektrometriás analízise

A tripszinnel emésztett fehérjék tömegspektrometriai analízisét Dr. Fazakas Ferenc végezte a DE OEC Klinikai Kutató Központjában. A fehérjék azonosítása MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) tömegspektrometriás eljárással történt. Az egyes fehérjék azonosítására a fragmentmintázat alapján van lehetőség.

A fehérjék gélben való tripszines emésztése:

A fehérje foltokat kivágtuk a Coomassie-Brillant Blue-val festett 2-D gélből. A kivágott géldarabokat először háromszor átmosva 200 mM ammónium-bikarbonát / 40%-os acetonitril oldattal mentesítettük a festéktől (10 perc), majd eltávolítottuk a felülúszót. Alacsony hőmérsékletre állított SpeedVac-ban 40 percig szárítottuk. A beszárított géldarabokat 30 percig, 60°C-on 5 mM DTT-t tartalmazó 25 mM NH_4HCO_3 -oldatban rehidráltuk, majd jódcetamidós alkilálás (25 μl , 55 mM IAM/25 mM NH_4HCO_3 , 30 percig, szobahőn, sötétben) következett, amelyet 25 mM ammónium-bikarbonátos mosás zárt. Ezután a gélben lévő fehérjéket tripszinnel (proteomics grade Trypsin Profile IGD Kit, Sigma-Aldrich) emésztettük egy éjszakán át, 37°C-on 9% acetonitril tartalmú 40 mM ammónium-bikarbonátban. A reakciót 2 μl 5%-os hangyasav adásával állítottuk le, majd a peptidek gélből való extrakcióját 20 perces szonikálással segítettük, ultrahangos vízfürdőben. A tömegspektrometriás analízist megelőzően a kinyert peptideket ZipTip[®]-pel (Millipore, Bedford, MA, USA) sómentesítettük.

Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével:

A mintákat MALDI-TOF minta tartó lemezre csöppentettük, és α -cyano mátrixban MALDI-TOF tömegspektrográfiával (Applied Biosystem Voyager-DE-STR) analizáltuk pozitív ion reflektor üzemmódban, 20000 V váltakozó feszültség használatával, 66%-os lézer intenzitással. A végső külső kalibrációhoz standard peptidet alkalmaztunk. A fehérjéket a peptidtömegek alapján az NCBI MASCOT programjával (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com>) azonosítottuk. A keresési paraméterekben a ciszteinek karbamidometilációját fix módosulásként, az ADP-ribosilációt pedig változó módosításként vettük figyelembe. Ha a MOWSE (MOlecular Weight Search) eredménye 76 vagy annál magasabb érték volt, akkor sikeresnek vettük a fehérje azonosítását. A 76-nál nagyobb protein score-ral rendelkező fehérjetalálatokat szignifikánsnak értékeltük. Eredményes azonosításhoz

a peptid fragment lefedettségnek meg kellett haladnia a 30%-ot.

6.2.2.8. A módosító csoport azonosítása HPLC-s módszerrel

A 6.2.2.1. pontban leírtak szerint készült M145 sejtkivonat (500 µl) fehérjét [³²P]NAD⁺ felhasználásával ADP-riboziláltuk, majd TCA-val kicsaptuk, a 6.2.2.2. pontban leírtaknak megfelelően. A csapadékot háromszor dietil-éterrel mostuk, majd 6 M guanidin-HCl koncentrációjú 500 µl 10 mM KOH oldatban felfuszpendáltuk. 100 µl mintát azonnal kivettünk belőle a radioaktivitás kezdeti értékének megméréséhez. A ³²P izotóppal jelölt fehérjék alkalikus hidrolízishez 3 órán keresztül 27°C-on inkubáltuk a mintát, majd a fehérjét perklórsavval kicsaptuk 0°C-on egy éjszakán át (Jouanneau és mtsai, 1989; Ochi és mtsai, 1992). A minta centrifugálását (12000 × g, 30 perc, 4°C) követően a felülúszó radioaktivitását határoztuk meg folyadék szcintillációs méréssel (Aquasol oldatban). 90 µl felülúszót kiegészítettük 10 µl nukleotid standard oldattal, ami 100-100 nM ADP-t, AMP-t és ADP-ribózt tartalmazott. A minta nukleotid tartalmát magas nyomású folyadék kromatográfiával (Waters 650E Solvent Delivery System) analizáltuk. A nukleotidokat fordított fázisú kromatográfiával, BST Si-100-S 10 C18 (250 mm×4,6 mm i.d., 5.0 µm részecske méretű) oszlopon, 1,8 ml/perc folyási sebességgel, az A pufferből B pufferbe való lineáris gradienssel választottuk el.

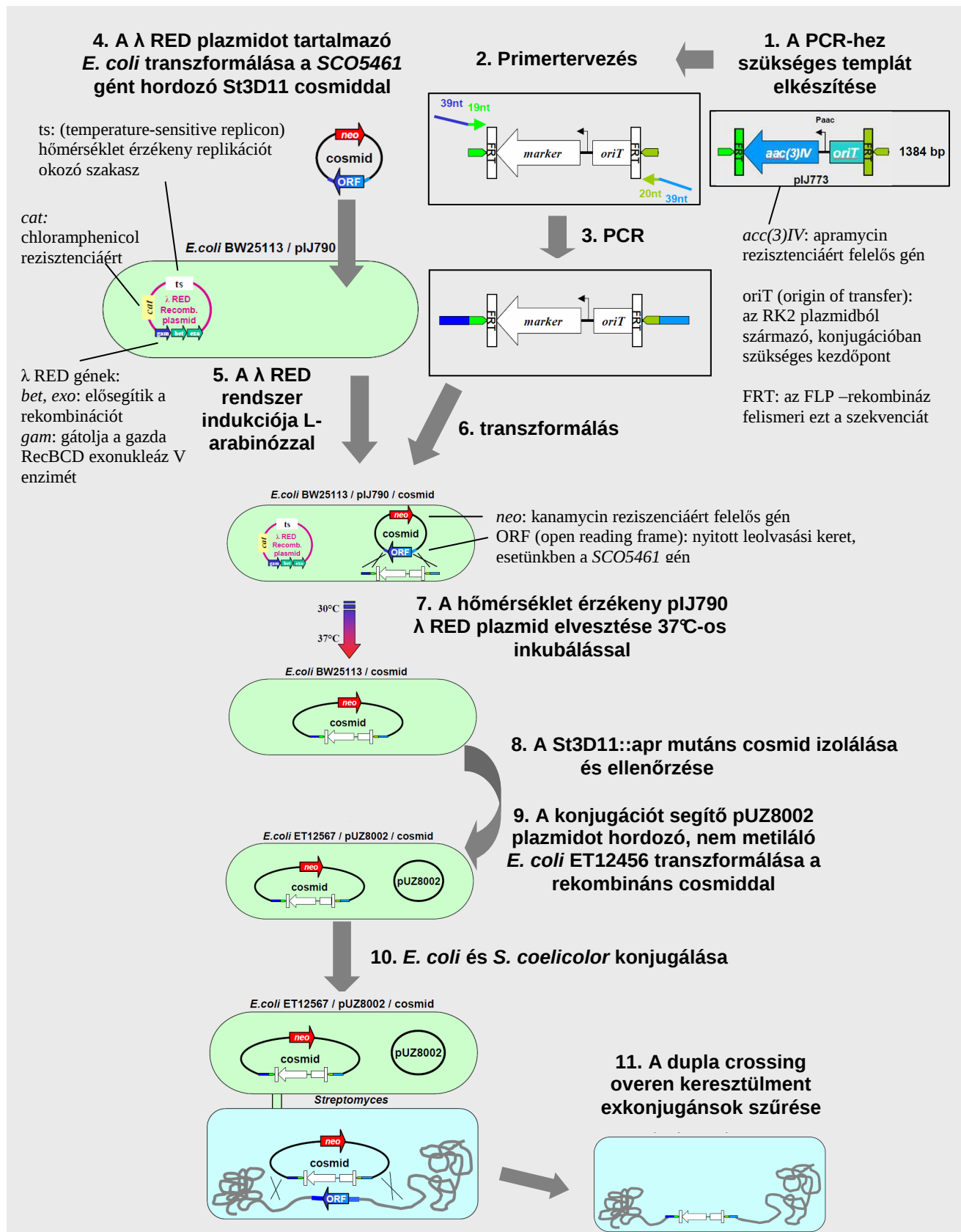
A puffer: 10% metanol tartalmú 10 mM KH₂PO₄ (pH=6,0)

B puffer: 50 mM KH₂PO₄ (pH=6,0)

Az eluálás közben 254 nm-en detektáltuk a nukleotidokat. Az átfolyó mintából 0,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk össze és szcintillációs módszerrel mértük a minták radioaktivitását (PerkinElmer Liquid Scintillation Analyzer 2800 TR). Minden mintából három párhuzamos mérést végeztünk.

6.2.3. A *S. coelicolor* M145 ΔSCO5461::*apr* null mutáns létrehozása ReDirect technikával

A ReDirect (Rapid Efficient Directed Recombination Time saving) technikával két fő lépésben helyettesítettük a SCO5461 gén genomialis allélját egy apramycin rezisztencia kazettával (Gust és mtsai, 2003). Először *E. coli*-ba transzformált, a SCO5461-et és genomi környezetét tartalmazó St3D11 cosmidon cseréltük ki a gént a kazettára helyspecifikus



5. ábra. A ReDirect technika folyamatábrája

A számokkal jelölt lépések részletes leírása a 6.2.3. alpontjaiban található.
(http://www.streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf alapján, módosítva)

rekombinációk útján. Ezt követően a kazettát tartalmazó cosmidot konjugálással juttattuk be *S. coelicolor* sejtbe, hogy ott szintén megtörténjen a mutagenizált cosmid és a kromoszóma között az a két átkereszteződés, amely a kazetta és a gén helycseréjét eredményezi (5. ábra).

Azért szükséges két lépésben végrehajtani a cserét, mivel a génre specifikus 5' és 3' végekkel rendelkező apramycin rezisztencia kazetta egy lineáris PCR termék, *Streptomyces*-ekben viszont nincs olyan rekombinációs rendszer ami amely egy lineáris DNS és a kromoszóma között lezajló rekombinációt végrehajtana. Az erre szolgáló λ RED rendszer *E. coli* gazdában működik hatékonyan. A három, a lambda fágok homológ rekombinációjához fontos gén (*gam*, *bet* és *exo*) plazmidon kódolt az *E. coli* BW25113/pIJ790 törzsben.

6.2.3.1. A génspecifikus kazetta elkészítése PCR-rel

Az *apra-oriT* PCR templát tisztítása:

1. Az *apra-oriT* kazettát hordozó pIJ773 plazmidot *E. coli* DH5 α törzsből izoláltuk GenElute midiprep kittel (Sigma) a gyártó utasításai szerint (5. ábra 1. pontja).
2. A pIJ773 plazmidból kihasítottuk restrikciós emésztéssel az apramycin rezisztencia gént hordozó kazettát. 100 μ l végtérfigatú reakcióban ~ 10 μ g DNS-t emésztettünk 50 U *Eco*RI (Fermentas) és 50 U *Hind*III (Fermentas) enzimekkel R pufferben (Fermentas).
3. Az emésztést ethidium-bromidot tartalmazó, 0,7%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd kivágtuk a kazettát tartalmazó 1398 bp-os fragmentet a gélből. A DNS-t QBIogene-GENECLEAN kittel a gyártó utasításai szerint izoláltuk a géldarabból. A tisztított kazettát 10 mM Tris-HCl (pH: 8) oldatban, 100 ng/ μ l oldatként -20°C-on tároltuk.

PCR primerek tervezése:

A SCO5461 megszakításához szükséges forward (F) primer 5' végén a gén transzkripció start pontja előtti 36 nukleotid és a kezdő ATG triplet (nagy betűvel) kapcsolódik egy 20 nukleotidnyi, az *apr* kazetta 3' végével komplementer szekvenciájú szakasszal (kis betűvel). 5461F primer: 5' CGG-AAT-GCG-TCG-CTC-CGC-GGC-CGG-GAT-CGT-ATC-CGC-ATG-att-ccg-ggg-atc-cgt-cga-cc 3'. A reverz (R) primer 5' végén a gén utolsó tripletjével és az azt követő 36 nt genomi DNS szekvenciával komplementer szakasz és ehhez kapcsolódva a kazetta 5' végével egyező 19 nt-os szekvencia található. 5461R primer: 5' CGC-TGT-TCC-TGC-GCC-CCT-GAG-CCA-GGA-CGG-CCG-GTG-TCA-tgt-agg-ctg-gag-ctg-ctt-c 3' (5. ábra 2. pontja). A nem kívánt rekombinációs folyamatok elkerülése végett BlastN kereséssel

meggyőződünk arról, hogy a gént és környezetét hordozó St3D11 cosmidon csak egy helyet, a SCO5461 lokuszt jelölnek ki a 39 bp-os szakaszok. Az St3D11 cosmid szekvenciája a Sanger Központ honlap-ján található (ftp.sanger.ac.uk/pub/S_coelicolor/cosmid_inserts).

A *Streptomyces* DNS magas G/C tartalma miatt DMSO-t használtunk. A primerek olvadáspontjának megfelelő hőmérséklet helyett azért alkalmaztunk az első 10 ciklusban 50°C, a következő 15 ciklusban pedig 55°C-ot, mert a primereknek csak a 3' harmada komplementer a templáthoz.

5 µl PCR terméket 1% agaróz gélen ellenőriztünk. A 39 bp-os meghosszabbítások miatt a kazettánál 78 bp-ral nagyobb, 1476 bp-os terméket vártunk (5. ábra 3. pontja).

PCR reakciók az 5461F/5461R primerpárral:

A PCR reakcióelegy összetevői:

5461F (Forward) (100 pmol/µl)	0,5 µl	/50 pmol
5461 R (Reverz) (100 pmol/µl)	0,5 µl	/50 pmol
Templát (100 ng/µl)	0,5 µl	/50 ng ≈ 0,06 pmol
Puffer (10x) (GoTaq colorless, -Mg)	5 µl	/1X
dNTP-k (10 mM) mindegyikből	1 µl	/50 µM mindegyikből
DMSO	2,5 µl	/5%
GoTaq DNS polimeráz (Promega)	1 µl	/2,5 unit
MilliQ ultratiszta víz	36 µl	

Végtérfogat: 50 µl

A „REDIRECT” PCR program lépései: denaturáció 94°C (2 perc); 10 ciklusban denaturáció 94°C (45 másodperc), hibridizáció 50°C (45 másodperc), szintézis 72°C (2 perc); 15 ciklusban denaturáció 94°C (45 másodperc), hibridizáció 55°C (45 másodperc), szintézis 7°C (2 perc); végül szintézis 72°C (5 perc).

A PCR termék tisztítása:

A PCR termék tisztítását MinElute PCR Purification kittel (QIAGEN) végeztük a gyártó utasításai szerint. Az vízzel eluált PCR termék koncentrációja ~200 ng/µl volt.

6.2.3.2. *E. coli* BW25113/pIJ790 transzformálása az St3D11 cosmiddal

1. Az *E. coli* BW25113/pIJ790 törzset egy éjszakán át 30°C-on, 200 rpm-mel rázatva növesztettük 10 ml LB + 25 µg/ml chloramphenicol folyékony táptalajban (5. ábra 4. pontja).
2. A kinőtt tenyészetből 100 µl-t 10 ml SOB + 20 mM MgSO₄ + 25 µg/ml chloramphenicol táptalajra oltottunk át.
3. A tenyészetet 3-4 órán át 30°C-on történő 200 rpm-mel való rázatással OD₆₀₀ ~ 0,6-ig növesztettük.
4. Lecentrifugáltuk a sejteket (6000 × g, 5 perc, 4°C).
5. A felülúszó leöntése után óvatosan felszuszpendáltuk a sejteket 10 ml jéghideg 10%-os glicerinben.
6. A centrifugálást megismételtük a 4. pontban írtak szerint. A felülúszó leöntése után 5 ml jéghideg 10%-os glicerinben szuszpendáltuk fel a sejteket, majd újra a 4. pontban leírtak szerinti centrifugálás és felülúszó leöntése következett. Végül a sejteket a ~100 µl rajtuk maradó 10%-os glicerinben szuszpendáltuk fel.
7. 50 µl sejtszuszpenziót összekevertünk ~ 100 ng (1-2 µl) St3D11 cosmid DNS-sel, majd áttettük egy jéghideg elektroporátor küvettába (0,2 cm) és BioRad GenePulser II elektroporátorral – a következő paraméterekkel: 200Ω, 25 µF, 2,5 kV – sokkoltuk a sejteket. Az elvárt idő konstans 4,5-4,9 msec.
8. A sokkolt sejtekhez a legrövidebb időn belül 1 ml jéghideg LB-t pipettáztunk, Eppendorf csőbe áttettük és 1 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk.
9. A sejteket LB agar + 50 µg/ml kanamycin + 25 µg/ml chloramphenicol lemezekre szélesztettük.
10. A tenyészeteket 30°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.
11. A Petri csészékben kinőtt telepek közül egyet, amely a többitől jól elkülönülten növekedett, áttoltunk egy Erlenmeyer lombikba 5 ml LB + 50 µg/ml kanamycin + 25 µg/ml chloramphenicol táptalajra.
12. Az egy éjszakán át 30°C-on rázatott tenyészetet másnap reggel, mint előkultúrát felhasználtuk a következő transzformálás kompetens sejtjének elkészítéséhez.

6.2.3.3. A *S. coelicolor* St3D11 cosmidot tartalmazó *E. coli* BW25113/pIJ790 transzformálása a PCR-rel amplifikált kazettával

1. A *S. coelicolor* St3D11 cosmidot tartalmazó *E. coli* BW25113/pIJ790 előtenyészet 1%-át leoltottuk 10 ml SOB + 50 µg/ml kanamycin + 25 µg/ml chloramphenicol táptalajra, amelyhez ezután 100 µl 1M L-arabinóz törzsoldatot adtunk, hogy indukáljuk a pIJ790 plazmidon lévő λ RED rendszer génjeit (5. ábra 5. pontja).
2. A kompetens sejtek felnövesztésének és mosásának lépései megegyeznek az előző elektroporálásnál a 3.-6. pontban leírtakkal.
3. 50 µl sejtuszpenziót ~ 200 ng (1 µl) tisztított PCR termékkel (6.2.3.1.) kevertük össze, majd áttettük egy jéghideg elektroporátor küvettába (0,2 cm) és BioRad GenePulser II elektroporátorral – a már ismert paraméterekkel: 200Ω, 25 µF, 2,5 kV – elektrosokkoltuk a sejteket. Az elvárt idő konstans 4,5-4,9 msec (5. ábra. 6. pont).
4. Rögtön 1 ml jéghideg SOC-ot tettünk a sokkolt sejtekhez és 1 órán át 37°C-on inkubáltuk.
8. A sejteket LB agar + 50 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml apramycin lemezekre szélesztettük. Mivel nem volt célunk további gének megszakítása a cosmidon, ezért 37°C-on inkubáltuk a transzformált sejteket, hogy elveszítsék a hőre érzékeny pIJ790 plazmidjukat (5. ábra 7. pontja).

6.2.3.4. St3D11::apr mutáns cosmid DNS izolálása és ellenőrzése

1. A Petri csészékben kinőtt transzformáns telepek közül egyet leoltottunk 5 ml LB + 50 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml apramycin táptalajra és 6 órán át 37°C-on rázatva növesztettük.
2. 4 ml tenyészetet 1ml-es adagokban centrifugáltuk (4000 rpm, 8 perc, 4°C), majd a felülúszót leöntöttük (5. ábra 8. pontja).
3. Az 1 ml kultúrából származó sejteket 100 µl I. oldatban szuszpendáltuk fel kémcsórázó segítségével.
4. Rögtön 200 µl II. oldatot adtunk hozzá és 10-szer átforgattuk fejfelé a csöveket.
5. Azonnal 150 µl III. oldatot adtunk hozzá és 5-ször átforgattuk a csöveket.
6. Az Eppendorf csöveket centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc, szobahő, Heraeus BIOFUGE pico centrifuga).
7. A felülúszót tiszta csőbe tettük át és azonnal 400 µl 1:1 fenol/kloroform elegyet tettünk hozzá. Az elválasztást elősegítendő 2 percig kémcsórázóval kevertettük a csöveket, majd centrifugáltuk (az előző lépésben írtak szerint).

8. A felső fázist áttettük új csőbe és 600 µl 2-propanolt adtunk hozzá. A minták 10 percig jégen álltak.
9. A csöveket centrifugáltuk (a 6. pontban írtak szerint), majd a felülúszó leszívása után 200 µl 70%-os etanollal mostuk az üledéket.
10. Újra centrifugáltunk a 6. pontban írtak szerint és 5 percig szobahőmérsékleten szárítottuk nyitott csőben a kicsapott DNS-t. 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH=8,0) pufferben szuszpendáltuk fel a cosmid DNS-t.

A kazetta jelenlétének ellenőrzése a mutáns cosmidban PCR-rel:

A *SCO5461* gén megszakításának bizonyítására az *E. coli* BW25113/ St3D11::apr cosmid transzformánsokból izolált cosmidot PCR-rel ellenőriztük. A felhasznált Str1: 5'-GCCACCTACGGGTGAGAAT-3'; Str2: 5'-GGACGAGGGATGGGTACG-3' primerpár a *SCO5461* gént megelőző genomi szekvencián a start előtti -24 pozíciótól indulva a gén stopja utáni utáni 504 bp-nyi genomi DNS szakasszal bezárólag vagy a gént, vagy az azt helyettesítő kazettát szaporítja fel. Ha ez a köztes szakasz az eredeti gént tartalmazza, akkor 1177 bp PCR termék, ha pedig a kazettát, akkor 1949 bp termék keletkezik.

A PCR reakcióelegy összetevői:

Str1 primer (100 pmol/µl)	0,5 µl	/ 50 pmol
Str2 primer (100 pmol/µl)	0,5 µl	/ 50 pmol
Templát (izolált cosmid, 100 ng/µl)	0,5 µl	/ 50ng ≈ 0,06 pmol
Puffer (10x)(Taq puffere, - MgCl ₂)	5 µl	/ 1X
dNTP-k (10 mM)	1 µl mindegyikből	/ 50 µM mindegyikből
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	/ 1,5 mM
DMSO	2,5 µl	/ 5%
Taq DNS polimeráz (Promega)	0,5 µl	/ 2,5 unit
MilliQ ultratiszta víz	33,5 µl	
Végtérfogat:	50 µl	

Az „ELLENŐRZŐ” PCR program lépései: denaturáció 95°C (5 perc); 30 ciklusban: denaturáció 95°C (30 másodperc), hibridizáció 53°C (30 másodperc), szintézis 72°C (1 perc 30 másodperc); végül szintézis 72°C (10 perc).

5 µl PCR terméket ellenőriztünk 1% agaróz gélen. A kazetta jelenléte miatt 1949 bp-os terméket vártunk.

6.2.3.5. A nem metiláló *E. coli* ET12567/pUZ8002 transzformálása, majd *S. coelicolor* M145 konjugálása a transzformánsokkal

1. Az *E. coli* ET12567/pUZ8002 kompetens sejt előállításához a sejteket 37°C-on növesztettük LB + 25 µg/ml kanamycin + 25 µg/ml chloramphenicol táptalajon, ezzel a pUZ8002 plazmidra és a *dam* mutációra való szelektálást segítettük elő (5. ábra 9. pontja).
2. A kompetens sejteket transzformáltuk az *oriT*-tartalmú kazettás cosmiddal, a 6.2.3.2. pontban leírtak szerinti elektroporálással. Az így kialakuló transzformánsokat 50 µg/ml apramycin tartalmú táptalajon szelektáltuk.
3. Leoltottunk egy transzformáns telepet 10 ml LB + 50 µg/ml apramycin + 50 µg/ml kanamycin + 25 µg/ml chloramphenicol táptalajra és egy éjszakán keresztül növesztettük 37°C-on rázatva.
4. Másnap a tenyészetből 100 ml-t átvettünk 10 ml friss LB + a fenti antibiotikumokat tartalmazó táptalajra és ~ 4 óráig növesztettük 37°C-on, OD₆₀₀ ~ 0,4-0,6 eléréséig.
5. Lecentrifugáltuk a sejteket (4000 rpm, 5 perc, 4°C, JOUAN K23 centrifuga).
6. A felülúszó leöntése után óvatosan felfuszpendáltuk a sejteket 10 ml LB-ben, hogy eltávolítsuk az antibiotikumokat amelyek gátolnák a *Streptomyces* növekedését. Ezt a mosási lépést a centrifugálásokkal együtt ismételtük, ezt követően pedig felfuszpendáltuk a sejteket 1 ml LB-ben.
7. Amíg az *E. coli* sejteket mostuk, addig konjugálásonként 10 µl (10⁸) *Streptomyces coelicolor* M145 spórát adtunk 500 µl 2 × YT táptalajhoz. Hősokkoltuk 50°C-on 10 percig és aztán hagytuk kihűlni (5. ábra 10. pontja).
8. Összekevertünk 0,5 ml *E. coli* sejtuszpenziót és 0,5 ml hősokkolt spórát. A mintát rövid ideig centrifugáltuk (30 másodperc, 3000 rpm, szobahő, BIOFUGE Pico Heraeus centrifuga). Leöntöttük a felülúszó nagy részét és a ~ 50 µl maradék folyadékban felfuszpendáltuk a sejteket.
9. Hígítási sort készítettünk a szuszpenzióból vízzel 10⁻¹-től 10⁻⁴-szeres hígításig, minden lépésnél 100 µl-es végtérfogattal.
10. Minden hígítást maradéktalanul szélesztettünk SFM + 10 mM MgCl₂ táptalajra és inkubáltuk 30°C-on 16-20 órán át.
11. Felülrétegeztük a lemezeket 1 ml víz + 0,5 mg nalidixinsav (20 µl a 25 mg/ml törzsoldatból, ez az antibiotikum szelektíven az *E. coli* sejteket pusztítja el) + 1,25 mg apramycin (25 µl az 50 mg/ml törzsoldatból) antibiotikum oldattal, amelyet egy kamóval óvatosan szélesztettük a tenyészetre. 30°C-on folytattuk az inkubálást másnapig.

6.2.3.6. Az exkonjugánsok szelektálása és DNS-ük ellenőrzése

A kettős átkezesztesződésen átmert, apramycin érzékennyé vált *Streptomyces* telepek szűrésé:

1. Replikáztunk vagy steril fogpiszkálóval átvittünk minden egyes SFM lemezen kinőtt kolóniát párhuzamosan LB + 25 µg/ml nalidixinsav + 50 µg/ml apramycin táptalajra és LB + 25 µg/ml nalidixinsav + 50 µg/ml apramycin + 50 µg/ml kanamycin táptalajra. A dupla átkezesztesződéses exkonjugánsok kanamycin érzékenyek és apramycin rezisztensek. (Az LB gyors, nem sporuláló növekedést tesz lehetővé) (5. ábra 11. pontja).
2. A kanamycin érzékeny klónokat egyenként átvittük sporulálációt elősegítő SFM + 25 µg/ml nalidixinsav + 50 µg/ml apramycin lemezekre és 30°C-on felnövesztettük.
3. A kinőtt telepeket a kanamycin szenzitivitásuk megerősítésére replikáztuk vagy fogpiszkálóval átvittük párhuzamosan LB + 25 µg/ml nalidixinsav és LB + 25 µg/ml nalidixinsav + 50 µg/ml kanamycin lemezekre.
4. A kanamycin érzékeny telepeket egyenként SFM + 50 µg/ml apramycin lemezekre oltottuk át és 30°C-on növesztettük spóra szuszpenzió készítéshez és a génmegszakítás PCR-rel való ellenőrzéséhez templátot szolgáltató genomi DNS izolálás előkészületeként.

***Streptomyces* kromoszómális (genomi) DNS izolálás:**

Nikodinovic módszerét használva izoláltunk genomiális DNS-t (Nikodinovic és mtsai, 2003).

1. 30 ml YMG + 0,5% (w/v) glicin tartalmú táptalajon 46 órán át, 28°C-on rázatva növesztett tenyészet centrifugálása (4000×g, 5 perc, 4°C) után az üledéket kétszer mostuk 10 ml 10% (w/v) szacharóz oldattal.
2. Az utolsó centrifugálást követően a sejteket 10 ml lízis oldatban szuszpendáltuk fel, majd 10 mg lizozim hozzáadása után 37°C-on, 20 percig, lassan mozgatva inkubáltuk.
3. 1 ml 10% (w/v) SDS-t és 5 mg proteináz K-t (Promega) adtunk hozzá és 55°C-on 1,5 óráig inkubáltuk.
4. 3,6 ml 5 M NaCl-dal és 15 ml kloroformmal 20 percig 6 rpm-mel ráztuk, majd centrifugáltuk (5000 × g, 20 perc, 4°C). A vizes fázist átvittük tiszta Beckmann csőbe.
6. 1 V izopropanollal kicsaptuk a DNS-t, majd centrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc, szobahő, BIOFUGE Pico Heraeus centrifuga).
7. 4-6 ml jéghideg, 70%-os etanollal mostuk és ismét centrifugáltuk (6. pontban írtak szerint).
8. 1 órán át szobahőn, levegőn szárítottuk, majd ~300-400 µl milliQ vízzel feloldottuk.

A konjugánsokból izolált genomi DNS ellenőrzése PCR-rel:

A 6.2.3.4. pontban leírt „ELLENŐRZŐ” PCR programmal és reakcióeleggyel, ez esetben az exkonjugáns *Streptomyces*-ből izolált genomi DNS-t használva templátként ellenőriztük, hogy a sejt eredeti SCO5461 génje érintetlenül maradt vagy az apramycin rezisztencia gént hordozó kazetta helyettesíti. Az utóbbi esetben 1949 bp-os PCR termékeket vártunk. A PCR terméket tisztítás után (QIAquick Gel Extraction kittel) *XhoI* restrikciós endonukleázzal D pufferben (Promega) emésztve is ellenőriztük.

6.2.4. Az *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* törzs komplementálása

A SCO5461 gén klónozása pWHM3 vectorba:

A SCO5461 gént hordozó St3D11 cosmidról amplifikált gént a pWHM3 ingázó *E. coli-Streptomyces* vektorba kívántuk klónozni a lacZ promotor mögé. Ehhez a primerekre terveztük a megfelelő restrikciós hasítóhelyeket. A polimeráz láncreakciót követően a PCR terméket és a pWHM3 vektort *EcoRI*-gyel és *HindIII*-mal (Promega) emésztettük. A gélből izolált inzertet és vektort ligáltuk, majd HB101 *E. coli* sejtekbe transzformáltuk.

A SCO5461 gént amplifikáló polimeráz láncreakció:

A PCR primerek 3' végein található a SCO5461 gén szekvenciájából származó, start kodontól induló 20 bp-nak, illetve a stop kodonnal végződő 19 bp-nak megfelelő komplementer szekvencia. A primerek 5' végére pedig a PCR termék klónozásához szükséges megfelelő restrikciós hasító helyeket terveztük. A forward primerben (5461HindStart) a start kodon előtt, azaz 5' irányban a genomi szekvenciából odaillő 2 bp van, ezt előzi meg a *HindIII* restrikciós endonukleáz 6 bp-nyi hasítási szekvenciája (aláhúzott). A reverz primerben (5461EcoStop) a stop kodonhoz kötődő TCA elé 1 bp került, mellette az *EcoRI* felismerő hely következik (aláhúzott). Mindkét primer 5' végén további 4-4 bp az endonukleáz aktivitás elősegítéséhez járul hozzá, azaz, hogy a hasítási hely a PCR terméken ne legyen túlzottan a szekvencia végén. A primerek másodlagos szerkezetét és heterodimer képzését Oligoanalyzer 3.1 programmal ellenőriztük (<http://www.idtdna.com/analyzer>).
5461HindStart primer: 5'-CAG GAA GCT TGC ATG ATC CAA CCA CTA GTC TG-3'
5461EcoStop primer: 5'-CAA TGA ATT CGT CAG TGC CAG GGC TGG TAG-3'.

A reakcióban a primer kötődés lépésében használt hőfok a primerek magas T_m pontja (74°C és 77,9°C) miatt kissé alacsonyabb a szokásos számolás szerinti (T_m-ek átlaga – 5°C)

értéknél. A termékmennyiség megnövelése és az aspecifikus sávok kiküszöbölése céljából különböző Mg^{2+} -ion koncentrációkkal (1-1,5-2 mM), a primer kötődési lépésben különböző hőmérsékletet használva (67-69-71°C) és a lánchosszabbítás idejének hosszát változtatva teszteltük a reakciókat.

5 µl PCR terméket 1% agaróz gélen ellenőriztünk. A PCR termék tisztítását MinElute PCR Purification kittel (QIAGEN) végeztük a cég leírása szerint.

A PCR reakcióelegy összetevői:

5461HindStart primer (Forward) (5 µM)	2 µl	/ 0,2 µM
5461EcoStop primer (Reverz) (5 µM)	2 µl	/ 0,2 µM
St3D11 cosmid templát (53 ng/µl)	2 µl	/ 50 ng $\approx$ 0,06 pmol
PCR puffer (10x) (Pfu puffer-Mg)	5 µl	/ 1X
dNTP mix (10 mM mindegyikből)	1 µl	/ 50 µM mindegyikből
MgSO ₄ (25 mM)	4 µl	/ 2 mM
DMSO	2,5 µl	/ 5%
Pfu DNS polimeráz (Fermentas)	1 µl	/ 2,5 unit
MilliQ ultratiszta víz	3 µl	

Végtérfogat:	50 µl	

A „PWHM3” program lépései: denaturáció 95°C (5 perc); 35 ciklusban: denaturáció 95°C (45 másodperc), hibridizáció 67°C (45 másodperc), szintézis 72°C (1,5 perc); végül szintézis 72°C (10 perc).

Restrikciós hasítás és ligálás:

A pWHM3 plazmidot és a tisztított PCR terméket *EcoRI* és *HindIII* (Fermentas) restrikciós enzimekkel, a cég leírása alapján R pufferrel 37°C-on 4 órán át emésztettük. A ligálandó fragmenteket gélből izoláltuk (QIAquick gélextrakciós kittel), hogy a levágott kis részeket elimináljuk és ezután ligáltunk.

A 10 µl végtérfogatú ligáz reakcióelegy összeállítása: 1 µl T4 ligáz (3 Weiss u/µl; Promega); 5 µl ligáz puffer (2 X); 1 µl pWHM3/*HindIII*-*EcoRI* (gélből izolált) vektor fragment (50 ng/µl); 2 µl SCO5461 (*HindIII*-mal és *EcoRI*-gyel emésztett és gélből izolált) inzert (50 ng/µl); 1µl nukleáz mentes MilliQ víz. A ligálási elegyet 16°C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

E. coli transzformálás és a transzformánsok szelektálása:

A ligálás termékeként keletkezett a pWH1 plazmid. Az *E. coli* HB101 törzsből elektrokompetens sejteket készítettünk (Maniatis és mtsai, 1982), majd GenePulser II elektroporátorral (BioRad) jéghideg elektroporátor küvettában (0,2 cm) transzformáltuk a sejteket a pWH1 plazmiddal a következő paraméterek beállításával: ellenállás / 200Ω, kapacitás / 25 μF, feszültség / 2,5 kV, (a várt 4,5-4,9 msec idő konstanssal). A sokkolt sejtekhez azonnal 1 ml jéghideg SOC-ot adtunk és 1 órán át 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően 100 μg/ml ampicillint, 0,5 mM IPTG-t és 80 μg/ml X-gal-t tartalmazó LB-agar lemezekre szélesztettük a baktérium sejteket és egy éjszakán át 37°C-on növesztettük. A pWH1 plazmidban a *βgal* gént megszakította a beékelődő SCO5461 gén, ezért a transzformánsokban nem termelődik β-galaktozidáz, amely az X-galból kék terméket állítana elő.

Streptomyces transzformálás:

Protoplaszt előállítása

1. 25 ml YEME táptalajra 0,1 ml spóraszuszpenziót oltottunk le és síkrázógépen lassan mozgatva, 30°C-on , 40 óráig inkubáltuk.
2. A tenyészetet centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc, 4°C, JOUAN K23 centrifuga).
3. A felülúszót leöntöttük és a sejteket 15 ml steril 10,3%-os szaharóz oldatban felfuszpendáltuk, majd ismételten centrifugáltunk a 2. pontban írtak szerint.
4. Megismételtük az előző mosás és centrifugálás lépést.
5. A felülúszót leöntöttük, majd a micéliumot 8 ml P pufferben oldott, sterilre szűrt 4 mg/ml-es lizozim oldatban szuszpendáltuk fel és inkubáltuk 30°C-on ~1 órán keresztül. Fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük.
6. Steril pipettával néhányszor felszívtuk a szuszpenziót az esetleges micéliális göbök megszüntetése céljából, majd további 15 percig inkubáltunk és újra mikroszkóposan ellenőriztük a protoplaszt képződést.
7. 5 ml P-puffert adtunk a szuszpenzióhoz és megismételtük az előző lépést. A protoplaszt képződést ismét fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük. (Ha nem volt kielégítő a protoplasztálás határfoka, akkor további 5 ml 1 mg/ml lizozim oldattal folytattuk az inkubálást a kívánt határfok eléréséig, maximum 2 órán keresztül.)
8. A protoplasztot leszűrtük steril vattán, hogy eltávolítsuk az esetleg nem protoplasztálódott micéliális formákat, majd steril műanyag csőbe öntöttük.

9. A protoplasztokat kicentrifugáltuk (4000 rpm, 7 perc, 25°C, JOUAN K23 centrifuga) és a felülúszót leöntöttük.

10. Végezetül a protoplasztokat 10 ml P-pufferben szuszpendáltuk fel, amelyből 5 ml-t -20°C-on tároltunk későbbi felhasználásig, a maradék 5 ml-rel kivitelezük a transzformálást.

Transzformálás

1. Centrifugáltuk a protoplasztot (3000 rpm, 7 perc, 25°C, JOUAN K23 centrifuga) és a felülúszót leöntöttük. Az üledéket a cső enyhe ütögetésével szuszpendáltuk fel a visszamaradó utolsó csepp pufferben.

2. Hozzáadtuk a plazmid DNS-t (maximum 10 µl pufferben).

3. Azonnal 0,5 ml 25%-os PEG tartalmú P-puffert adtunk még hozzá és automata pipettában néhányszor felpipettázva összekevertük a szuszpenziót.

4. 2-3 percnyi állás után hozzáadtunk 5 ml P-puffert, majd centrifugáltuk a protoplasztot (3000 rpm, 7 perc, 25°C).

5. Leöntöttük a felülúszót, és újabb 1 ml P-pufferben szuszpendáltuk fel a protoplasztot.

6. 250 µl szuszpenziót szélesztettünk R5 lemezekre és inkubáltuk 30°C-on 20-24 óráig.

7. 1 ml 500 µg/ml koncentrációjú thiostrepton oldattal (lemezenként 1980 µl desztillált víz és 20 µl 50 mg/ml koncentrációjú thiostrepton törzsoldat) felülrétegeztük a transzformációs lemezeinket.

8. 30°C-on inkubáltuk a lemezeket további néhány napig, amíg a telepek spórát képeztek. Két nap után a transzformánsok telepei már láthatóakká váltak.

6.2.5. Mikroszkópos módszerek

6.2.5.1. Sztereomikroszkópos fotózás

Az SMMS, SMMS+10% szacharóz és az R5 táptalajokon növesztett 2, 3, 4 napos és 1 hetes *S. coelicolor* M145 és a Δ SCO5461::*apr* mutáns tenyészetek Nikon SMZ-2T sztereomikroszkóppal 10-60× nagyítással látott, alulról mesterséges fénnnyel átvilágított vagy oldalról napfénnnyel megvilágított felszínét Olympus CAMEDIA Digital Camera C-4000 Zoom fényképezőgéppel fotóztuk le. A 2 és 3 napos tenyészeteknél használtunk inkább mesterséges fényt, később az antibiotikumtermelés és a légmicéliumok miatt átvilágíthatatlanná váltak a tenyészetek.

6.2.5.2. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat

A fáziskontraszt mikroszkóp lényegében egy speciális kondenzorral és fáziskontraszt objektívvel kiegészített hagyományos fénymikroszkóp, amelynek segítségével nagy kontrasztot lehet elérni élő, azaz festékekkel nem kezelhető és egyéb festetlen minták esetében is (Lodish és mtsai, 2000).

SMMS, SMMS+10% szacharóz és R5 táptalajba állított üveg fedőlemezekre ránövesztettük az M145 és a mutáns M145 Δ SCO5461::*apr* *Streptomyces* törzseket. 3 nappal a leoltás után a fedőlemezeket kihúztuk a táptalajból és azonnal metanollal fixáltuk a mintákat. A kiszáritott fedőlemezeket egy csepp glicerinnel megnedvesítve tárgylemezre fordítottuk. OLYMPUS BX40 mikroszkóppal, 1000×nagyítással vizsgáltuk a mintákat. OLYMPUS DP70 kamerával fotókat készítettünk.

6.2.5.3. A *Streptomyces* minták DNS tartalmának vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns törzset apramycint tartalmazó, a vad típusú *S. coelicolor* M145 törzset antibiotikum mentes SMMS, SMMS+10% szacharóz és R5 táptalajokba állított üveg fedőlemezekre növesztettük 2 napig illetve 1 hétig (3.2.1.2.pontban leírák szerint). A DNS festéséhez a fedőlemezekre 20 μ l illetve 50 μ g/ml propídium-jodid került az alkoholban fertőtlenített, beszámozott tárgylemezre pedig 10 μ l Mowiol[®]. A kettőt egymásra borítottuk és a felesleg leitatása után a már kész mintákat fénytől védve egy óráig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Végül a mintákat 4°C-os hűtőbe tettük.

A propídium-jodidos festéshez nem volt szükség a festés előtt más kezelésre, mert a metanolos fixálás permeabilizálta a membránt, így az ép membránon áthatolni képtelen festékekkel elérhetővé vált a DNS. Ha a festék DNS-hez kötődik, fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka jelentősen megnő.

Dr. Vámosi György és Kovács Krisztina segítségével a DE OEC Biofizika Intézetében lévő konfokális mikroszkóppal (Olympus FV1000 Confocal Microscope) készítettük el a felvételeket. A vizsgálatok során 543 nm-es hélium-neon, illetve 488 nm-es argon lézert és ImageJ 1.44p programot használtunk.

6.2.6. A törzsek antibiotikum termelésének és szekréciójának vizsgálata

Szilárd táptalajon növesztett tenyészetek antibiotikum termelése:

A *Streptomyces* M145 vad típusú és a M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns törzset a mutáns esetében 50 μ g/ml apramycin tartalmú, a vadnál antibiotikum mentes szilárd SMMS, SMMS+10% szacharóz és R5 táptalajon, a lemez felületére helyezett steril filteren (Paraplan nitrocellulóz, 0,2 μ m, Millipore) növesztettük. A koronggal együtt a micélium maradéktalanul eltávolítható egy hét elteltével, és a különböző tenyészetek esetében a táptalajba diffundált antibiotikumok mennyisége szemmel összehasonlíthatóvá válik. A leoltást követő 3. és 7. napon fotókat készítettünk a filterkorongos tenyészetekről, ezután pedig eltávolítottuk a korongokkal együtt a micéliumot és az alatta elszíneződött táptalajt is lefénképeztük.

Folyékony táptalajon növesztett tenyészetek γ -actinorhodin termelésének mérése:

A folyékony SFM-ben 4 nap alatt felnövesztett *S. coelicolor* M145 és az *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns törzs tenyészetének lecentrifugálása után ($12000 \times g$, 10 perc, 4°C) a felülúszókból az extracelluláris γ -actinorhodin mennyiségét határoztuk meg.

Ehhez a felülúszót 1N HCl oldattal pH=2-3-ra savanyítottuk, majd fél térfogatnyi metanol:kloroform (1:1) elegyet adtunk hozzá, és kémcsőkeverővel intenzíven kevertettük. A centrifugálást ($3000 \times g$, 10 perc, 4°C) követően a kloroformos fázis abszorbanciáját 542 nm-en fotométerrel mértük. Az abszorbancia arányos a felülúszó γ -actinorhodin koncentrációjával.

Az 1 mg fehérjetartalomra vonatkoztatott γ -actinorhodin koncentráció megadásához a felülúszó és az üledék fehérje tartalmát is Coomassie Protein Assay reagenssel (Pierce) határoztuk meg. Az üledékben lévő micéliumokat ultrahanggal feltártuk, majd 1 M NaOH oldattal hidrolizáltuk 37°C -os vízfürdőben inkubálva 16 órán keresztül. Centrifugálás ($6000 \times g$, 10 perc, 4°C) után a felülúszót semlegesítettük. A kiindulási és az üledék feldolgozásával nyert felülúszóból is 20-20 μ l-t 1-1 ml Coomassie protein assay reagenssel elkeverve 595 nm-en fotometráltuk. A fehérje mennyiség meghatározásához BSA (bovine serum albumin) standard fehérje hígítási sort használtunk (micro teszt cső protokoll, 1-25 μ g/ml). A kimutatás a Bradford eljárás alapján, azaz a Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 oldat savas közegben fehérjékkel kék komplexet képez. Az 595 nm-en mérhető abszorbancia változása arányos a minta fehérjetartalmával (Kieser és mtsai, 2001).

6.3. Bioinformatikai elemzések

A *S. coelicolor* M145 tenyészet sejtkivonatából származó, MALDI-TOF tömegspektrometriával analizált ADP-ribozilált fehérjét a tripszines emésztéssel keletkező peptidfragmentumok tömege alapján az NCBI Mascot programjával [Matrix Science; (<http://www.matrixscience.com>)] azonosítottuk.

A *S. coelicolor* genomjában található ADPRT enzimeket kódoló gének keresését, a DNS szekvencia adatok pozíció-érzékeny összehasonlítását az NCBI honlapján található PBLAST és PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) és a StrepDB adatbázisban (<http://streptomyces.org.uk>) lévő StrepDB BLAST szekvencia homológia kereső programok segítségével végeztük el.

A SCO5461 fehérje aminosavszekvenciáját a SCO5461 gén ortológjainak géntermékével és a további homológ fehérjékkel többszörös szekvenciaillesztéssel hasonlítottuk össze, amelyet a ClustalW2 programmal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) végeztünk, majd a konzervált aminosavakat a Boxshade 3.31 program segítségével emeltük ki (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html>).

A SCO5461 fehérje legvalószínűbb másodlagos szerkezetét az SSPRED program (<http://www.coot.embl.de/~fmilpetz/SSPRED>) és Tmpred server (<http://ch.embnet.org>) használatával kaptuk, 3-D szerkezetét pedig a (PS)² automata homológia modellező szerver segítségével készítettük el (<http://ps2.life.nctu.edu.tw>).

A SCO5461 fehérje N-terminális feltételezett szignál szekvenciáját a SignalP (3.0 verzió) programmal (<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 (<http://www.signalfind.org> és <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP-1.0>).

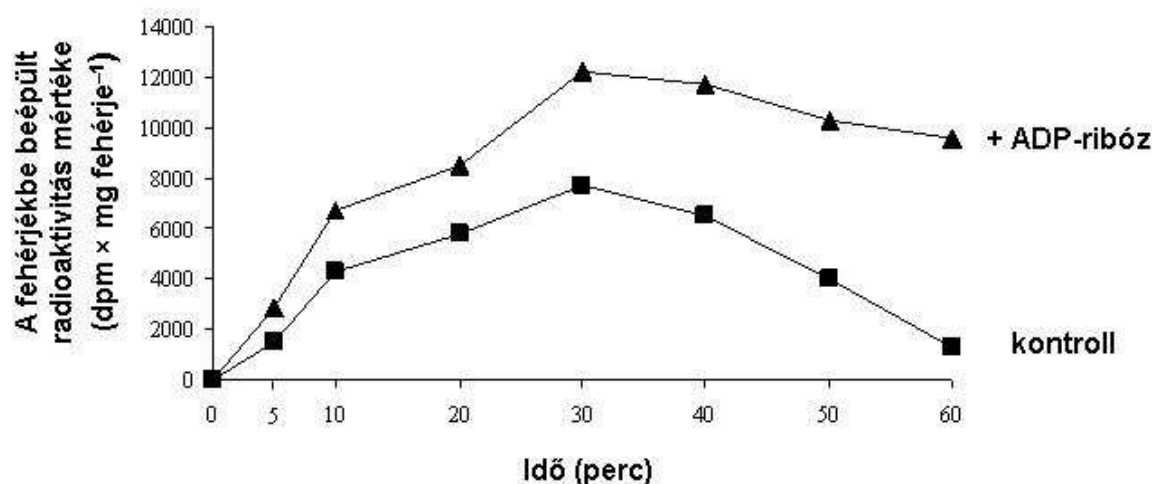
Az amplifikációhoz felhasznált oligonukleotid primerek másodlagos szerkezetét és heterodimer képzését Oligoanalyzer 3.1 programmal (<http://www.idtdna.com/analyzer>) ellenőriztük. A nem kívánt rekombinációs folyamatok elkerülése végett BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) kereséssel győződünk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

7. EREDMÉNYEK

7.1. ADP-ribózilált fehérjék azonosítása *Streptomyces coelicolor*-ból

A *S. griseus*-szal korábban végzett kísérletek tapasztalatait figyelembe véve, elsőként a fehérjék ADP-ribózilációjához szükséges optimális kísérleti feltételeket állítottuk be. Meghatároztuk a 36 órás korú, SFM táptalaj felszínén, celofánon növesztett *S. coelicolor* M145 tenyészet sejtjeiből készült nyers sejt kivonat fehérjeibe történő ADP-ribóz beépülés időfüggését. A mintát kettéosztottuk és az egyiket kiegészítettük 500 μ M ADP-ribózzal. Mindkét reakcióelegyből 3-3 párhuzamos mintát készítve 100 μ M [2,8- 3 H-adenin]NAD $^+$ ($7,5 \times 10^7$ Bq) szubsztrát hozzáadásával indítottuk az ADP-ribózilációs reakciót. A mintákból a 0., 5. percben, aztán pedig 10 percenként 100-100 μ l reakcióelegyet kivéve folyadék szcintillációs módszerrel meghatároztuk a TCA-val kicsapható fehérjékbe történt radioaktív ADP-ribóz beépülés mértékét. Az ADP-ribózzal kiegészített mintában – a kontrollban mérthez képest – folyamatosan magasabb ADPRT aktivitást mértünk mind a három párhuzamos mintapár esetében.

Az 6. ábrán látható, hogy 30 perc után csökkenni kezd a fehérjékbe beépült ADP-ribóz mennyisége. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a citoplazma kivonatban lévő NAD glikohidroláz elbontja a NAD $^+$ -ot, az ADP-ribóz-fehérje glikohidroláz pedig lehasítja a



6. ábra. A fehérjékbe történő ADP-ribóz beépülés időfüggésének és a mintához adott ADP-ribóz hatásának vizsgálata SFM-agaron növesztett *Streptomyces coelicolor* M145 micéliumból nyert sejtmentes citoplazma kivonatban

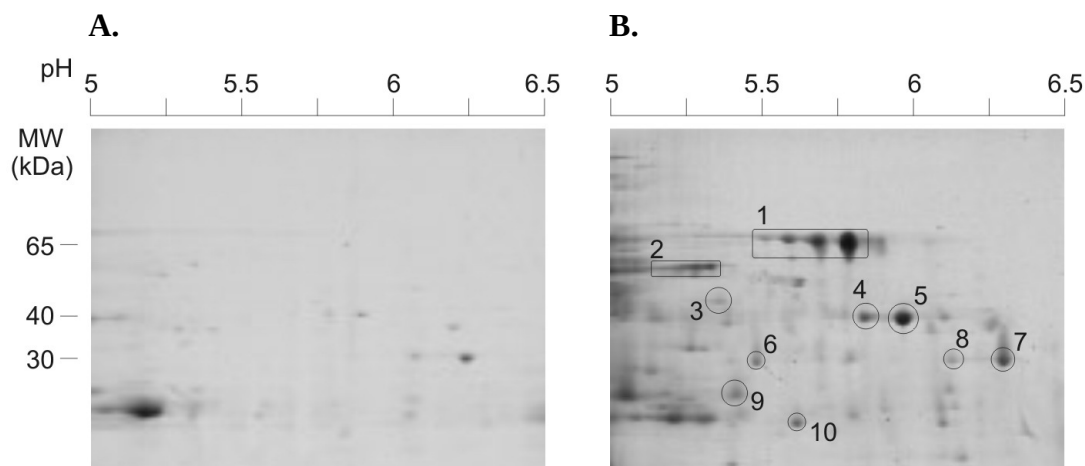
Minden adatpont három független mérés eredményének átlaga.

■: kontroll minta, ▲: 500 μ M ADP-ribózzal kiegészített minta.

fehérjékbe beépült ADP-ribózt. A mintához adott ADP-ribóz gátolja az ADP-ribóz-fehérje glikohidrolázt, ezért nagyobb mértékű – a kontrollban mérthez képest – a „hideg” ADP-ribózzal kiegészített mintákban az ADP-ribóz beépülés. A jelöletlen ADP-ribóz hozzáadásával azt is biztosítjuk, hogy csak az ADPRT enzim katalizálta enzimatis fehére ADP-ribozilációt mérjük, ugyanis a nagy feleslegben lévő hideg ADP-ribóz megakadályozza, hogy a citoplazma kivonatban lévő NAD glikohidroláz által a radioaktív NAD^+ -ból előállított jelzett ADP-ribóz nem enzimatis úton, Schiff bázis-képzéssel beépüljön a fehérjékbe (Penyige és mtsai, 1990).

Az optimális reakció idő meghatározása után megpróbáltuk azonosítani a *S. coelicolor* sejt kivonatában kimutatható ADP-ribozilált fehérjéket. A módszertani részben leírt módon celofánon, SFM táptalajon növesztett, 36 órás, *S. coelicolor* M145 tenyészet sejtjeit ultrahanggal feltártuk és centrifugálással leülepitettük a sejt törmelékét. Ezután a sejtmentes citoplazmakivonatot 30 percig 30°C-on előinkubáltuk, majd kettéosztottuk. Az egyik mintához szubsztrátként 250 μM jelöletlen NAD^+ -ot adtunk, a másik mintához azonos térfogatú dH_2O -t, majd a továbbiakban mindkét mintát azonos körülmények között kezeltük. 30°C-on 30 percig tartó inkubálást követően a reakciót 9x-es térfogatnyi jéghideg aceton hozzáadásával állítottuk le, a fehérjéket egy éjszakán át -20°C-on tartva csaptuk ki. A kicsapott fehérjéket 150 mM NaCl-t, 10 mM MgCl_2 -t, 0,005% SDS-t és 500 mM ureát tartalmazó 20 mM-os HEPES pufferben (pH 8,6) felfuszpendáltuk és a mintákból az ADP-ribozilált fehérjéket m-aminofenilboronsav affinitáskromatográfiás eljárással tisztítottuk tovább. Az affinitáskromatográfiás oszlopról 200 mM szorbitollal oldottuk le a fehérjéket, majd – YM 3000-es filtert használva – ultraszűréssel bekontcentráltuk.

A mintákból származó fehérjéket 2-D SDS-PAGE gélen választottuk szét és Coomassie Brilliant Blue oldattal megfestettük. Amint az a 7. ábrán látható, a kontroll, nem ADP-ribozilált mintában is találhatóak fehérjék. Ezek pozíciója gyakorlatilag megegyezik egyes, az ADP-ribozilált mintából izolált fehérjék pozíciójával. Feltételezhetően a kontroll mintában látható fehérjék endogén módon ADP-ribozilált fehérjék, amelyekről a 30 perces előinkubálás alatt a ADP-ribozil-protein glikohidroláz nem távolította el az ADP-ribóz csoportot. Az m-aminofenilboronsav-agaróz oszlophoz vicinális diolt tartalmazó glikozilált fehérjék is kötődhetnek, ezeknek a kontroll mintában is jelen kell lenniük. Egyes baktériumokban írtak már le glikozilált fehérjéket, pl. *Clostridium* és *Streptococcus* törzsekben, *Mycobacterium tuberculosis*-ban, de *Streptomyces*-ekben még nem találtak glikozilált fehérjét (Messner, 2004). Ennek ismeretében, óvatosságból, csak a kontroll mintához viszonyítva újonnan megjelenő vagy lényegesen megnövekedett mennyiségű fehérjéket vettük ADP-riboziláltk.



7. ábra. Az *in vitro* ADP-riboszilált mintából és a kezeltlen kontroll sejtkivonatából izolált ADP-riboszilált, 2-D gélen szétválasztott fehérjék mintázata

A kontrollhoz viszonyítva lényegesen intenzívebb, illetőleg újonnan megjelenő foltokban levő fehérjéket tekintettük enzimatikusan ADP-riboszilált fehérjének. **A.**: A nem ADP-riboszilált kontroll mintából származó fehérjék mintázata **B.**: Az *in vitro* ADP-riboszilált mintából származó fehérjék mintázata. A szögletes keretbe foglalt foltokban egy fehérje különböző izoformái vannak jelen, ezek keletkezése poszttranszlációs modifikációval vagy spontán dezaminációval magyarázható; a körökben levő foltok pedig egy adott fehérje két izoformáját tartalmazzák: az eredeti fehérjét, ill. az ADP-riboszilált formát.

ADP-riboszilált fehérjék azonosítása tömegspektrometriás módszerrel

A Coomassie Blue-val festett 2-D gélen lévő foltokban található fehérjék azonosítására gélben történő tripszines emésztést és a fragmentek MALDI-TOF módszerrel történő analízisét használtuk, amelynek eredményét a 2. táblázat tartalmazza. A mintából 8 fehérjét tudtunk azonosítani, amelyek 10 eltérő pozícióban találhatóak a gélen (7. ábra, 3. táblázat).

Az 1-es számú, kerettel jelölt csoport minden foltjában a SCO5477 gén termékének izoformáit sikerült azonosítanunk. A SCO5477 fehérje egy oligopeptid ABC transzporter ligand-kötő, periplazmatikus lipoprotein alegysége. A SCO5477 gén a *bldKB* paralógja. A BldKB fehérjéhez hasonlóan a SCO5477 fehérje is tartalmazza LLTTAACG, a fehérje lipiddel való módosításához szükséges motívumot és valószínűleg egy membrán felszínéhez kötött fehérje. A csoport minden izoformájának pozíciója a teljes fehérje ismert molekulatömegének megfelelő. A foltok pI-ja viszont a várt értékhez képest alacsonyabb, amit magyarázhat a fehérje ADP-riboszilációja [egy negatív töltést hordozó foszfát csoport $\sim 0,2$ egységgel csökkentheti a fehérje izoelektromos pontját (Vincent és mtsai, 1999)]. Az elnyúlt 2-es foltban a glutamin szintetáz I (GSI, GlnA, glutamát-ammónia-ligáz) enzimfehérje

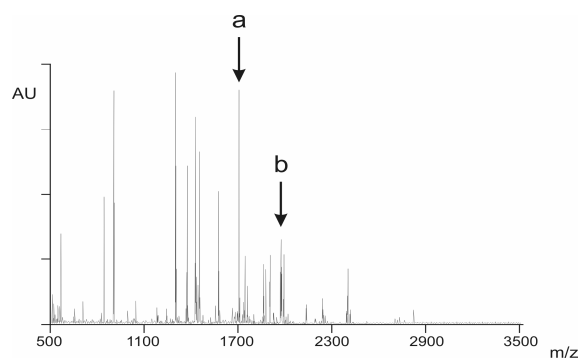
található, amelyet a *SCO2198* gén kódol. A fehérje molekulatömege és izoelektromos pontja is megfelel a *S. coelicolor* GSI aminosavsorrendjéből számított értékeknek. A foltokban található mindegyik fehérjéből sikerült MALDI-TOF analízissel azonosítani azt a 395-420 aminosavakat tartalmazó triptikus fragmentet, amelyben az adenililálható, konzervált Tyr-397 található. A fragment 2807,4 Da-os mólótömege azt mutatja, hogy a mintánkban a GSI nem volt adenililálva a konzervált Tyr-397-en.

A 3-as foltból egy feltételezett periplazmatikus fehérjét, a *SCO2008*-at azonosítottuk. Ez a fehérje is egy ABC transzporter komplex periplazmatikus, elágazó láncú aminosavat kötő

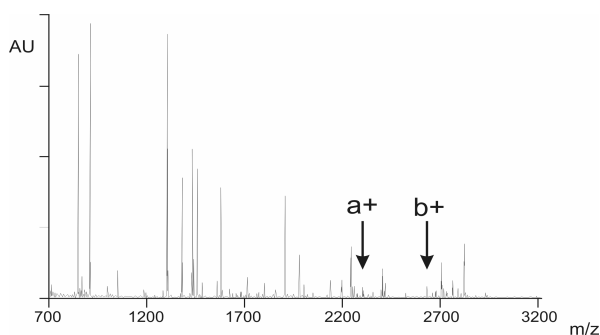
A.



B.



C.



8. ábra. A 4-es és 5-ös foltból izolált IMPDH triptikus peptidfragmentjeinek aminosav sorrendje (A.) nyilakkal jelölt pozíciójuk a módosítatlan fehérje MALDI-TOF tömegspektrogramján (B.), az 4-es foltban található, két különböző arginin is ADP-ribozilált, az eredetihez képest megnövekedett molekulatömegű peptidfragmenteknek megfelelő csúcsok (a+, b+) tömegspektrogramon (C.)

A vastag betűvel kiemelt argininek a feltételezett ADP-ribozilált aminosavak az IMPDH-ban.

lipoprotein alegysége. Ezt a fehérjét cisztein oldalláncon ADP-ribózilált formában Sugawara és munkatársai is azonosították már korábban (Sugawara és mtsai, 2002).

A 4-es és az 5-ös foltban az inozin-5'-monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) fehérje található. Az 5-ös folt helyzete megfelel a módosítás nélküli teljes IMPDH molekulatömegének és pI értékének. A 4-es foltban levő izoforma kissé nagyobb molekulatömegű, de pI-ja alacsonyabb, mint a fehérje eredeti pI-ja. A MASCOT web alapú keresőprogramban a poszttranszlációs modifikációs lehetőségek beállításával sikerült azonosítanunk, hogy a fehérje a 207-225 és a 226-245 triptikus peptid fragment tömege a várt 1699,8 Da és 2123,1 Da értékekhez képest 541 Da-nal megnövekedett (2240,8 Da-ra és 2664,1 Da-ra). A fragment nagyobb molekulatömege egyik aminosavának ADP-ribózilációjával magyarázható. A peptidfragmentek analízise alapján megállapítható, hogy az IMPDH két különböző helyen lehet ADP-ribózilálva. Miután mind a két fragment tartalmaz Arg-t, lehetséges, hogy a Arg-225 és az Arg-244 a két módosított aminosav. Ezek a fragmentek az IMPDH egyik erősen konzervált régiójának a részét alkotják (8. ábra).

A 6-os foltban a SCO1968 fehérje azonosítható. Ez egy feltételezett szekretált hidroláz, amely a glikofoszfopiról-diészter-foszfodiészteráz családba tartozik. A fehérje pI-ja – a 2-D gélen elfoglalt pozíciója alapján – alacsonyabb, mint a fehérje eredeti pI-ja. A molekulatömege kis mértékben alacsonyabb a fehérje ismert móltömegénél. Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy egyes ADP-ribózilált fehérjék esetében megfigyelhető elektroforetikus mobilitás változás, ami lehet akár látszólagos molekulatömeg csökkenés vagy növekedés is (Bornancin és mtsai, 1992; Vincent és mtsai, 1999).

7-es és 8-as foltból a FOLD (metilén tetrahydrofolát dehidrogenáz/tetrahydrofolát ciklohidroláz; génje a SCO4824) bifunkcionális proteint azonosítottuk. A 7-es folt van a FOLD helyes pozíciójában. A 8-as foltnak azonban az ismert értéknél savasabb az izoelektromos pontja. A 8-as foltban lévő fehérje tripszines emésztésével kapott fragmentek közül hiányzott a 158-166 peptid fragment (885,5 Da), viszont megjelent egy új, 1426,4 Da-os fragment, a különbség itt is 541 Da, ami megfelel az ADP-ribóz móltömegének. Az újonnan megjelent fragmentumban található Arg-166-ot tartjuk a nagy valószínűséggel ADP-ribózilált aminosavnak.

A 9-es foltban a SCO6108 jelzésű *fusH* gén termékét, a FusH feltételezett extracelluláris észterázt sikerült azonosítani. Ez egy szteránvázas antibiotikumra, a fuzidinsavra specifikus észteráz, amely hidrolizálja és ezzel inaktíválja az antibiotikumot (Haar és mtsai, 1997). A 9-es foltban lévő fehérjének azonban sokkal alacsonyabb a molekulatömege és savasabb a pI-je, mint az eredeti, nem módosított proteinnek. A FusH homológja *Streptomyces lividans*-ban

egy prekursor (zimogén) fehérje (UniProt: Q54345), amiből az aktív enzim limitált proteolízis hatására alakul ki és szekretált extracelluláris enzimként látja el a funkcióját. A 9-es a foltban talált fehérje nem a teljes *S. coelicolor* FusH fehérjét reprezentálja, hanem nagyjából a molekula felét kitevő fragment.

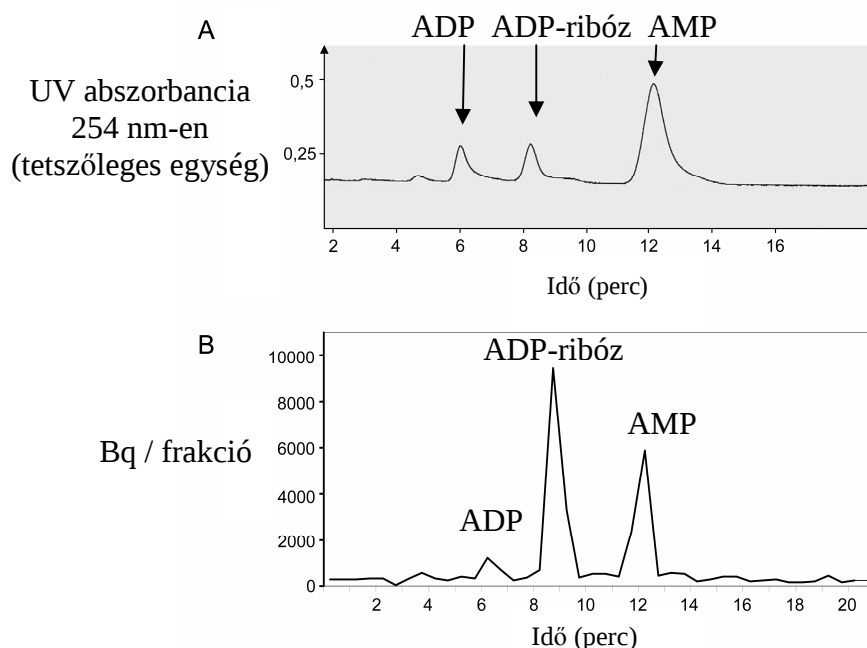
A 10-es foltban a SCO7629 gén terméke, a SpaA fehérje található, amely a mandulasav racemáz/mukonsav laktonizáló enzimsaládba tartozik. A SpaA az *E. coli* RspA éhezés indukált fehérjéjének a homológja (Huisman és Kolter, 1994; Piette és mtsai, 2005). A módosítás helye ismeretlen ebben a proteinben, mivel a foltban talált fehérje tripszin fragmentjei csak a SpaA fehérje C-terminálisát reprezentálják.

3. táblázat. A *Streptomyces coelicolor* M145 törzsből izolált és a 2-D gélen megjelölt 10 foltból (F) MALDI TOF analízissel azonosított nyolc, *in vitro* ADP-riboszilált fehérje jellemzői.

F	Gén	Fehérje	Feltételezett vagy ismert funkció	Szekréción szignál-szekvencia	Molekulatömeg és pI várt és mért értéke	Szekvencia lefedettség
1	SCO5477	feltételezett oligopeptid kötő lipoprotein	<u>Transzport:</u> egy ABC transzporter komplex ligandkötő alegysége	N terminális, lipoproteinekre jellemző	65,3 kDa; 6,5 65,4 kDa; 5,8	41%
2	SCO2198	glutamin-szintetáz	<u>Metabolizmus:</u> N ₂ -asszimiláció	nincs	52,6 kDa; 5,3 52 kDa; 5,3	55%
3	SCO2008	feltételezett aminosavkötő lipoprotein	<u>Transzport:</u> egy ABC transzporter komplex ligandkötő alegysége	N-terminális, lipoproteinekre jellemző	43,5 kDa; 5,5 44 kDa; 5,4	47%
4 és 5	SCO4771	inozin-5'-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH)	<u>Metabolizmus:</u> nukleotid bioszintézis	nincs	40,1 kDa; 5,9 40 kDa; 5,9 és 5,6	83%
6	SCO1968	feltételezett szekretált hidroláz	<u>Metabolizmus:</u> glicero-foszfodiészter-foszfodiészteráz	N-terminális, valószínűleg levágódik	31,4 kDa; 5,5 30 kDa; 5,4	44%
7 és 8	SCO4824	FolD (metilén tetrahidrofolát dehidrogenáz/ metilén tetrahidrofolát ciklohidroláz)	<u>Metabolizmus:</u> a tetrahidrofolát 1 szénatomos módosulatainak egymásba alakítása	nincs	29,8 kDa; 6,3 30 kDa; 6,3 és 6,1	51%
9	SCO6108	FusH (szekretált észteráz)	fuzidinsav rezisztencia	hidrofób, membránt átrő N-terminális domén	55,4 kDa; 5,9 28 kDa; 5,4	31%
10	SCO7629	SpaA (éhezés-indukálta enzim)	<u>Metabolizmus:</u> mandulasav racemáz /mukonsav laktonizáló enzimsalád tagja	nincs	45,2 kDa; 5,9 24 kDa; 5,7	33%

7.1.1. A módosító csoport azonosítása HPLC-s módszerrel

Annak bizonyítása érdekében, hogy az ADP-ribozilációs reakcióból izolált fehérjékhez valóban ADP-ribóz kapcsolódik, magas nyomású folyadékkromatográfia segítségével azonosítottuk a módosított fehérjék hidrolíziséből keletkező radioaktív nukleotidot. Ehhez az ADP-ribozilációs reakció időfüggésének vizsgálatához használt sejtkivonat elkészítésével azonos módon készítettünk sejtkivonatot, amely fehérjeit radioaktívan jelölt [^{32}P]NAD⁺ szubsztráttal ADP riboziláltuk és TCA-val kicsaptuk ugyanúgy, mint azt már fentebb is leírtuk. A csapadékot dietil-éterrel mostuk, majd guanidin-HCl tartalmú KOH oldatban felfuszpendáltuk. 100 μl mintát azonnal kivettünk belőle, hogy folyadék szcintillációs módszerrel a radioaktivitás kezdeti értékét megmérjük. A ^{32}P izotóppal jelölt fehérjéket az KOH-os alkalikus hidrolízisüket követően perklórsavval kicsaptuk. A lecentrifugált minta felülúszójának radioaktivitását folyadék szcintillációs méréssel határoztuk meg. A felülúszót ADP, AMP és ADP-ribóz tartalmú nukleotid standard oldattal egészítettük ki, hogy ezek jelenlétét magas nyomású folyadék kromatográfiával, fordított fázisú C18 oszlopot használva



9. ábra. *S. coelicolor* M145-ből készült sejtkivonat előzőleg [^{32}P]NAD⁺-dal inkubált fehérjeinek alkalikus hidrolízisét követő fordított fázisú HPLC analízis eredménye

A. A mintában lévő nukleotidok elúciós mintázata, a csúcsok balról jobbra az ADP, az ADP-ribóz és az AMP jelenlétére utalnak. **B.** A különböző frakciók folyadék szcintillációval mért radioaktivitás-értékei.

detektálhassuk és így különböző frakciókba tudjuk gyűjteni a lehidrolizált, radioaktívan jelölt nukleotidokat. Az eluált frakciók radioaktivitását szcintillációs számlálóval mértük. A háromszoros párhuzamos kísérlet eredményei összecsengenek. Az ADP-ribózzal együtt eluáltuk a legtöbb radioaktív nukleotidot (58,1%), ezt követte az AMP-vel együtt eluálódó radioaktív AMP (37,7%). Csak egy kicsi frakciónyi (8,1%) radioaktív nukleotid eluálódott az ADP-vel együtt (9. ábra).

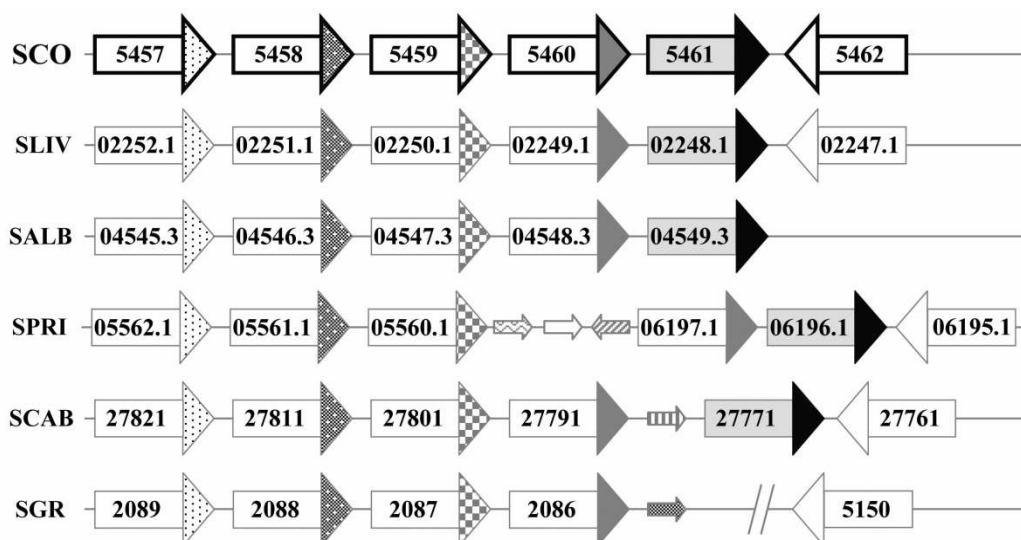
7.2. ADPRT enzimet kódoló gén azonosítása a *S. coelicolor*-ban

Noha már évekkel ezelőtt kimutattuk a fehérjék ADP-ribosilációt a *Streptomyces*-ekben, a sejtekben jelenlevő ADPRT enzimet nem tudtuk izolálni. Saját valamint Sugawara és munkacsoportja által publikált eredmények alapján igen valószínű, hogy a *S. coelicolor*-ban Arg és Cys oldalláncra specifikus ADP-ribosiltranszferáz enzimek is jelen vannak (Penyige és mtsai, 1990; Sugawara és mtsai, 2002).

Az *S. coelicolor* genomban megtalálható a *Mycobacterium smegmatis*-ban lévő rifampicin ADP-ribosiltranszferázzal, az Arr-ms fehérjével homológ fehérje génje, az *arr-sc*, de más ADPRT-t nem találtak a StrepDB adatbázisban található gének annotációja során (<http://streptomyces.org.uk>; Actinomycetales group Database, <http://broadinstitute.org>). Az ADPRT-okra jellemző rövid motívumok aminosav sorrendjének ismeretében szekvencia homológia kereső programok felhasználásával (PBLAST, PSI-BLAST, StrepDB BLAST) a *S. coelicolor* genomjában sikerült azonosítanunk a SCO5461 gént, melynek fehérje terméke nagy valószínűséggel egy ADPRT enzim.

7.2.1. A SCO5461 gén és ortológjai a megszekvenált *Streptomyces* fajok genomjában

A SCO5461 gén a *S. coelicolor* kromoszóma túlnyomórészt létfontosságú, konzervált géneket tartalmazó központi régiójában található. Előtte 5' irányban, vele azonos orientációban négy gén helyezkedik el (SCO5457-SCO5460), így kézenfekvőnek tűnhet annak feltételezése, hogy ezek egy operon elemei lehetnek, de erre nincs kísérletes bizonyíték. A SCO5461-et 3' irányban egy ellentétes orientációjú gén, a SCO5462 követi, amely már nem tartozik a feltételezett operonhoz. Az öt azonos orientációjú gén ortológjait öt *Streptomyces* törzs genomjában találtuk meg (StrepDB, <http://streptomyces.org.uk>; Actinomycetales group Database, <http://broadinstitute.org>) (10. ábra).

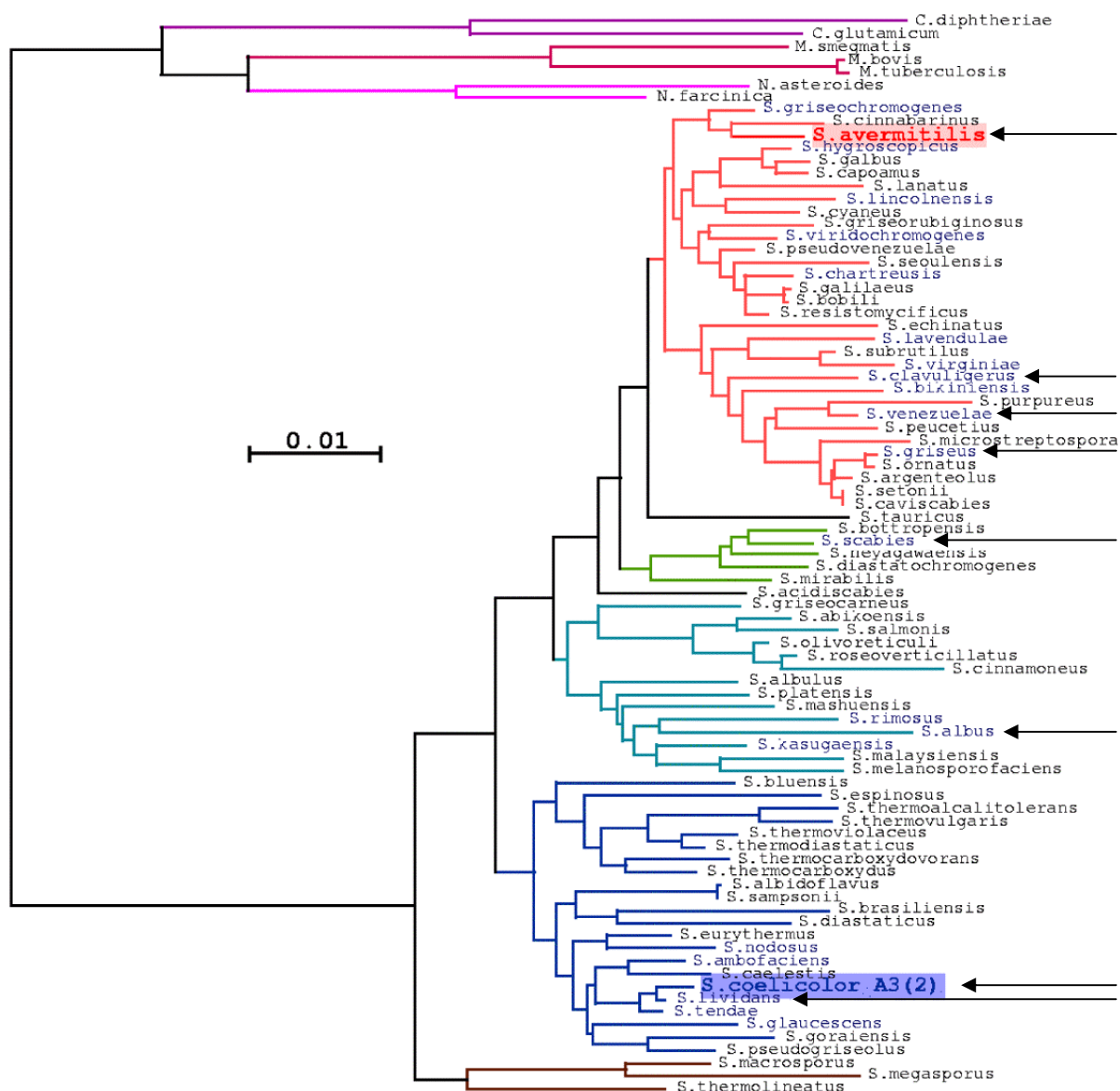


10. ábra. A SCO5461 genomiális környezetben található gének és ortológjaik a megszekvenált *Streptomyces* genomokban

A fajokat jelölő rövidítések jelentése a következő: SCO: *S. coelicolor*, SLIV: *S. lividans* TK24, SALB: *S. albus* J1074, SPRI: *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, SCA: *S. scabies*, SGR: *S. griseus*). Az ortológ géneket a nyílak hegyének azonos mintázata jelzi. A számokkal nem jelzett kis nyílak beékelődött géneket jeleznek. A *S. griseus* esetén a SCO5462-nek megfelelő ortológ gén - elkülönülve a többi ortológ együttesétől - a genom távolabbi részében található meg.

A *S. coelicolor* legközelebbi rokonában, a *S. lividans*-ban az ortológ gén elhelyezkedése teljesen azonos a *S. coelicolor*-ban találttal. Ahogy egyre nő a távolság a filogenetikai törzsfán (11. ábra) a törzsek között, egyre több eltérés tapasztalható. A *S. albus*-ban változatlan formában megtalálható a feltételezett operon, de a SCO5462 ortológja nincs jelen. A *S. pristinaespiralis*-ban már 3 gén ékelődött be az „operon közepébe”. A távolabbi rokonokkal is hasonlóságot mutató *S. scabies*-ben közvetlenül a SCO5461-ortológ mellett a *S. pristinaespiralis*-ban levőtől különböző beékelődött gén ugyanebben a pozícióban a *S. griseus*-ban is megtalálható (10. ábra).

A törzsfán *S. coelicolor*-hoz viszonyítva távolabbi ágakon elhelyezkedő *Streptomyces* fajokban (*S. griseus*, *S. venezuelae*, *S. clavuligerus*, *S. avermitilis*) az öt azonos orientációjú génből csak négynek van ortológja (*S. clavuligerus*-ban csak háromnak), mivel ezekben nem található meg a SCO5461-hez hasonló szekvencia. A *S. scabies*-ben talált, a SCO5461-ortológ mellé beékelődött SCAB27781 gén ortológja viszont jelen van az említett törzsekben, tehát a *S. scabies* a közeli és a távoli rokon törzsek közötti átmenetnek tekinthető az általunk vizsgált gének szerveződése tekintetében, amivel teljesen összecseng a *Streptomyces*-ek törzsfáján a *S. coelicolor*-ral közeli és a távoli rokon csoport közötti köztes elhelyezkedése is (11. ábra).



11. ábra. A *Streptomyces*-ek 16S rRNS-e alapján készített filogenetikai törzsfaja

A nyilakkal megjelölt fajok genomját már megszekvenálták, ezért ezeket felhasználtuk a szekvenciahomológia-keresésben (www.ls.kitasato-u.ac.jp/tree2.html).

A *S. coelicolor*-nak ebben a feltételezett operonjában egyetlen génnek sem bizonyították eddig kísérletesen a funkcióját. Ez igaz a fentebb említett ortológjaira is. A *Streptomyces* adatbázisban a SCO5461 génhez fűzött rövid összefoglaló (annotáció) a gén termékét egy feltehetően nem processzálnak N-terminális szignállal rendelkező szekretált fehérjének írja le (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Legtöbb ortológjának (*S. lividans* TK24, SSPG_02248.1; *S. albus* J1074, SSHG_04549.3; *S. scabies*, SCAB27771; *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, SSDG_06196.1) terméke is feltételezett szekretált fehérje. A feltételezett

operonban található többi fehérje között a *SCO5459*-nek és ortológjainak a termékei egyöntetűen feltételezett enoil-CoA-hidratázok, míg a *SCO5458* és az összes ortológja feltételezett lipoproteinek kódolnak. A *SCO5457* Aba-A-típusú regulátor proteint kódol, mint ahogy az a *S. scabies*-ben és a *S. griseus*-ban lévő génnek szintén egy lipoprotein a terméke, szintúgy a többi *Streptomyces*-ben lévő ortológjának.

SCO	MITTSIRRRRTAAAVLSLSAVL---ATTAATAPGAAPAPSAAPAKAA-PACPQFDDRTKAA
SLIV	MITTRIIRRRRTAAAVLSLSAVL---ATTAATAPGAAPAPSAAPAKAA-PACPQFDDRTKAA
SCAB	-----VRRRAAAVLSLSAVL---ATSAATAPAQTPTATATSAKAAAPACPRFDDPFVHAA
SPRI	MITTRSIRRRRAAVITLALAATLVPAAGTAAGTASTPAAPAARAAT-ATCPDLGDPLHAA
SALB	M--TRIIRRRRAAATLSLSALL--AAPAVSAAEPAAPAAPAPRAA-ANCPVVEDPLTAA
consensus	*** *
SCO	ADRGVDVDRIITPEPVWRTTCGILYRSDSRGPQVVFEEGFHAKDVQNGQYDVEKYVLVNQP
SLIV	ADRGVDVDRIITPEPVWRTTCGILYRSDSRGPQVVFEEGFHAKDVQNGQYDVEKYVLVNQP
SCAB	ADPRVDVERITPDPVWRTTCGILYRSDSRGPVAVVFEEGFHAKDVQNGQYDIEKYVLVNQP
SPRI	ADRSVDIDRIITPKPSFRDNCRLYRADGRAPEVIFDQGFHPKAPQNGQYDIEKYVLVNQP
SALB	ADPRVDAGRITPEPAFRDNCRLYRADGRPPAVIFDEGFHPKDTVNGQYDLEAYVLVNQP
consensus	** *
SCO	SEYVSTSYDHDLYKTWYKSGYNYVDAPGGIDVNKTIGDTHKWALQVEVAFPGGIQRKYI
SLIV	SEYVSTSYDHDLYKTWYKSGYNYIDAPGGIDVNKTIGDTHKWALQVEVAFPGGIQRKYI
SCAB	SEYVSTTYDHDLYKTWYKSGYNYIDAPGGVDVNKTIGDRHKWALQVEVAFPGGIIRTEFI
SPRI	SEYVSTTYDHDLYKQW-KSAWNYIDAPGGIDVNRTIGDTHRWALQAEVAFPGGIARDFI
SALB	SEYVSTTYDHDLYKQW-KSDWNYIDAPGGIDVNRTIGDTHRWALQREVAFAGGIRSEFI
consensus	** *
SCO	IGVCPVDRQTKTEIMSDCESNPHYQPWH---
SLIV	IGVCPVDRQTKTEIMSDCESNPHYQPWH--X
SCAB	IGVCPVDKKTRTEKMSECVGNPHYEPWH--X
SPRI	VGACPVDKQTKREIMSECRDNPNYLPWR-LX
SALB	VGACPIDRAAKQEIMGECVDNPQYRPWRRRX
consensus	* *

12. ábra. A *SCO5461* gén és ortológ génjei fehérjetermékeinek szekvenciaillesztése

A fajokat jelölő rövidítések jelentése a következő: SCO: *S. coelicolor*, SLIV: *S. lividans* TK24, SALB: *S. albus* J1074, SPRI: *S. pristinaespiralis* ATCC 25486, SCA: *S. scabies*, SGR: *S. griseus*. A 1-3 számmal jelölt, vastag vonalas keretekkel az ADPRT enzimekre jellemző konzervált motívumokat emeltük ki. A vékony vonalas keretekben található aminosav motívumok illetve egy-egy aminosav az adott fehérje N terminális szignálszekvenciájában található.

A *SCO5461* által kódolt fehérje aminosav szekvenciája nagyfokú azonosságot mutat a rokon törzsekben található ortológok által kódolt fehérjék aminosavsorrendjével. Az azonosság foka 99% az *S. lividans* fehérjeje esetében, 77% a *S. scabies* esetén, 69% a *S.*

pristinaespiralis-ban lévő ortológ gén termékénél és 65% a *S. albus* fehérjét nézve. Nem meglepő módon különösen nagyfokú az azonosság az ADP-ribosziltranszferázokra jellemző három konzervált motívum aminosavsorrendjét tekintve (12. ábra).

7.2.2. A SCO5461 gén feltételezett fehérje termékének homológjai

Az ADPRT enzimekre jellemző nagyfokú szekvenciabeli plaszticitás megnehezíti az ide sorolható enzimfehérjék *in silico* felismerését, ezért a PSI-BLAST programmal próbáltuk a SCO5461 protein homológjait azonosítani. A pozíció-érzékeny PSI-BLAST az ismételt szekvencia illesztések adatai alapján egy olyan keresési mátrixot generál, amelyben a konzervált aminosavak nagyobb súllyal esnek latba, mint a nem konzerváltak, ezáltal az

5461	-----MIITSLRRRTAAAVLSLSAVLATT	
Pierisin-1	MA-----DRQPYMTNGIQAAVVEWIRALDLEII SLL	
Pierisin-2	MS-----NNPPYMTNGIQAAVVEWIRALDLEII SLL	
MTX	MAIKKVLKIIILAIIIIISCQLPLNQKTVYASPNSPKDN TWIQAASLTWLMDSLSLYQLI	
CT-A	-----	
consensus	-----	1
5461	ATAPGAAPAPS AAPAKAAPAC PQFDDRTKAAADRGV DVDRITPEPVWRTTCGTLYRSDSR	
Pierisin-1	LSR--AWPMAL LATS ELRWR-PTVLTDIDNV-----VRLDRRQRLVRWDRR	
Pierisin-2	LSR--AWPLAL LTT ELRWR-PTVLTDIDNV-----VRLDRRQRLVRWDRR	
MTX	SIR--IPSF A--SPNGLYMR-EQTIDSN TGQ-----IQIDNEHRLLRWDRR	
CT-A	-----MVKIIIFVFFIFLSSF SYANDDKLYRADSR	
consensus	-----	2
5461	GPQVVFEEG-FHAKDVQN-----GQYDVEK-----YVLVNQPSPIYVSTSYDHDLY	
Pierisin-1	PPNEIFLDG-FVPIVIRE-----N-PDWEETDLYGFAKNNHPSIFVSTTKTQRNK	
Pierisin-2	PPNEIFLDG-FVPIVIRE-----D-PDWEETDLYGFAKNNHPSIFVSTTKTQRNK	
MTX	PPNDIFLNG-FIPRVTNQ-----NLS PVEDTHLLNLYRTNSPSIFVSTTRARYNN	
CT-A	PDDEIKQS GGLMPRGQNE YFDRGTQMNINLYDHARGTQTGFVR--HDDGYVSTSI SLRSA	
consensus	*-----	3
5461	---KTWYKSG-----YNYIVD-APGGIDVNKTI G-DTHKWADQVEVAFPGGIQRKYI	
Pierisin-1	---KKYVWTPR NANRGIVYQYEIY-APGGVDVND SFS-DAS PWPNQMEVAFPGGIQNIYI	
Pierisin-2	---KKYVWTPR NANRGIVYQYEIY-APGGVDVND SFS-DAS PWPNQMEVAFPGGIQNIYI	
MTX	LGLEITPWT PH SANNNIYRYEIF-APGGIDINAS LSRNHNPFNEDEITFPGGIRPEFI	
CT-A	HLVGQITILSGHST---YIYV IATAPNMFNVNDVLG-AYSHPDQEVSALGGIPYSQI	
consensus	---*-----	
5461	-----IGVC PVD RQTKTEIMSDCE SNPHYQP-----WHX---	
Pierisin-1	RSARELHN GR I-QRIWINPNFLDPGDLEPIVSSSRT-----PQVIWRMNHP	
Pierisin-2	RSARELHN GRV-QRIWINPNFLDPGDLEPIVSSSRT-----LQVIWRVNHP	
MTX	RSTYEVHNGE I-VRIWINPNFINPSTLNDVSGPSNI-----SKVFWHENS	
CT-A	YGWYRVHFGV LDEQLHRNRGYRDRYYSLDIA PAADGYGLAGFPPEHRAWREEPWI HHAP	
consensus	-----*	
5461	-----	
Pierisin-1	DGGHRDQRSER SASSY--DD	
Pierisin-2	DGGNKDGRSER STSSY--DD	
MTX	EGNMDSKGFI LLDLYNQDF	
CT-A	PGCGNAPRSSMSNTCD--EK	
consensus	-----	

13. ábra. A SCO5461 és homológjai közötti többszörös szekvenciaillesztés

A minden fehérjében azonos aminosavak jelölésére a fekete boxok és a consensus sorban lévő csillagok szolgálnak, a szürke boxok és alul a pontok pedig a SCO5461-ben és még legalább egy fehérjében azonos aminosavakat jelölik. Az 1-3 számú kerettel az ADPRT aktivitáshoz szükséges konzervált szekvencia motívumokat emeltük ki.

egymással csak korlátozott aminosav szekvencia azonosságot mutató, nagyon távoli fehérje családok tagjai is megtalálhatóak.

A PSI-BLAST keresésünk eredménye alapján a SCO5461 (a *Streptomyces* fajokban találtakon kívül) a *Pieris rapae* (répalepke) DNS-specifikus ADP-ribosziltranszferázának, a pierisin-1 fehérjéjének katalitikus alegységével (34% azonosság, 43% pozitív), a *P. brassicae* (káposztalepke) pierisin-2 fehérjéjének katalitikus alegységével (35% azonosság, 44% pozitív), a *Bacillus sphaericus* által termelt, mono-ADP-ribosziltranszferáz mosquitocid toxinnal (MTX1; 31% azonosság, 46% pozitív) és végül, de nem utolsósorban a kolera toxin katalitikus A alegységével (CT-A, 24% azonosság, 34% pozitív) mutat homológiát. A többszörös szekvenciaillesztés eredményét a 13. ábra mutatja.

Erős homológiát találtunk még a *Streptomyces*-ekkel közeli rokonságban lévő *Streptosporangium roseum* DSM 4321 hipotetikus fehérjéjével (YP_003344216.1) is. Ebben 42% a SCO5461-ével azonos aminosavak aránya, a 3 ADPRT-okra jellemző szekvencia-motívum lényegében megegyezik a *S. coelicolor* fehérjéjében levőkkel.

7.2.3. A SCO5461 fehérje szerkezete *in silico* adatok alapján

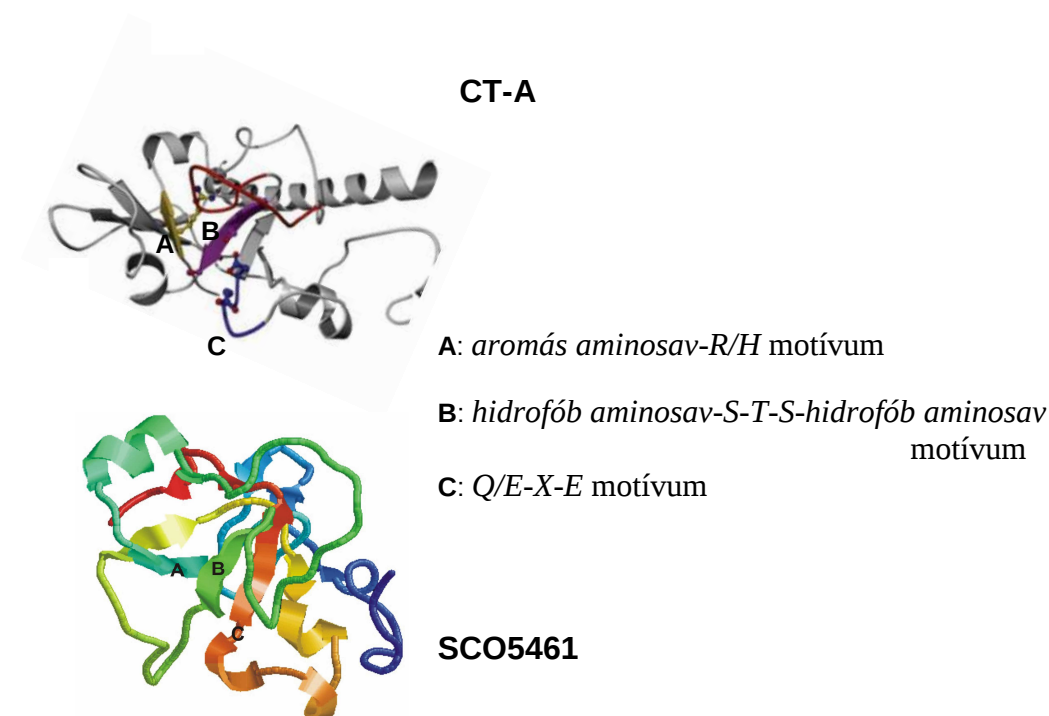
7.2.3.1. Az mono-ADP-ribosziltranszferáz enzimekre jellemző konzervált motívumok a SCO5461 fehérjében

A többszörös szekvenciaillesztéssel történt összehasonlításokkal azt találtuk, hogy a SCO5461 protein minden olyan konzervált motívumot tartalmaz, amely az ADPRT enzimcsaládra jellemző. Az Irodalmi áttekintésben ezeket már részletesen ismertettem. A SCO5461-ben lévő YR szekvencia megfelel a CT-csoportba tartozó enzimekre jellemző *aromás aminosav-R/H* motívumnak; az YVSTSY szekvencia megfelel az *aromás-hidrofób-S-T-S-hidrofób* motívumnak; végül a QVE megfelel a *Q/E-X-E* motívumnak (8/C. ábra) (Holbourn és mtsai, 2006).

Figyelemre méltó az, hogy a SCO5461 legközelebbi homológjainak a szekvenciák összehasonlításából kapott aminosav azonosságok számértékét tekintve a pierisinek és aztán az MTX tekinthetőek, de ha az enzimaktivitás szempontjából legfontosabbnak ítélt konzervált szekvencia-motívumokat vesszük figyelembe, akkor a CT-A bizonyul a legközelebbi homológnak. Ha például a konzervált motívumokban található legfontosabb 10 aminosavat hasonlítjuk csak össze, akkor a SCO5461 és a CT-A között 90% azonosságot kapunk, sőt, az aminosavak 100%-a pozitív. Az MTX-nél ezzel a számolással csak 60% az azonosság, 90%

pozitív, míg a pierisineknél szintén 60% azonosságot találunk és 80% pozitívitást. Az MTX és a pierisin fehérjék az 1. motívumban a fontos arginin melletti aromás, hidrofób tirozin helyett hidrofób aminosavat (V ill. L) tartalmaznak. A 2. motívumban a három központi aminosav (Y-V-S-T-S) azonos a SCO5461-ben levővel, csupán a határon lévő aminosavak nem egyezők. A kolera toxinban az említett 2. motívum teljesen egyezik a SCO5461-ével. A 3. motívum az MTX-ben és a CT-A-ban is, akárcsak a többi CT-szerű toxinban jellemzően E-X-E (Nagahama és mtsai, 2000). Az enzim működése szempontjából a leginkább konzervált, katalitikus glutaminsav mellet csak a pierisinekben találunk a SCO5461-ben meglevő glutamint (Q-X-E).

7.2.3.2. A SCO5461 protein feltételezhető szekunder és terciér szerkezete



14. ábra. A kolera toxin A alegység 3-D szerkezetének és a SCO5461 fehérje általunk megjósolt 3-D szerkezetének összehasonlítása

Az A és B jelzésű motívumoknak nem csak szekvenciája azonos, hanem az elhelyezkedése is. CT-A-ban A a sárga, B a lila nyíllal jelzett, míg a SCO5461 modellben A a sötétzöld, B a világoszöld β -lemezen található. A C motívum a CT-A-ban a kék színű hurkon, a SCO5461 modellben pedig a narancsszínű β -lemezeket összekötő szakasz elülső határán fekszik. A feltételezett modellen a kék színtől indulva fokozatos színátmenet jelzi a fehérje szekvencia elejétől való távolodást. A CT-A szalagmodellje Holbourn és munkatársainak cikkéből (Holbourn és mtsai, 2006) származik, a SCO5461 szalagmodellt pedig a kolera toxin modelljére való rávetítéssel, PS2 modellező szoftverrel készítettük.

Az ADP-ribosziláló toxinok családjára iránti nagy érdeklődésnek köszönhetően számos ADPRT enzim három-dimenziós szerkezetét már meghatározták, köztük a már említett MTX-ét és a CT-A-ét is (Reinert és mtsai, 2006; Zhang és mtsai, 1995). Ezekre az ismert szerkezetekre és a szekvenciahomológiára alapozva a PS2 modellező szoftver alkalmazásával elkészítettük a SCO5461 fehérje 3D struktúráját (14. ábra).

A csak részleges aminosav szekvencia hasonlóság ellenére a SCO5461 proteinben található β lemezek és α hélixek alkotta konformáció megfelel az ADPRT enzimek három-dimenziós szerkezetében az aktív centrumot alkotó fehérjeváznak. A SCO5461-ben a konzervált YR és YVSTSY motívum a kolera toxinhoz hasonlóan az első és második, egymásra merőlegesen álló β -lemezen van, míg a katalitikus Glu-154 a kolera toxinnál egy β -lemez és egy α -hélix közötti ARRT hurokban, míg ebben a fehérjében két β -lemez közötti, az ARTT huroknak megfelelő hurok határán található (Holbourn és mtsai, 2006) (14. ábra).

A SCO5461 fehérje aminosav sorrendje alapján a fehérje feltételezhető szekunder struktúráját (16. ábra) egy másodlagos szerkezetet jósoló program, az SSPRED segítségével határoztuk meg. A program által javasolt szekunder struktúra a benne található β -lemezek, α -hélixek és rendezetlen szakaszok számát és helyzetét tekintve jól összeegyeztethető a megjósolt 3-D szerkezettel. A konzervált motívumok mind a PS2, mind az SSPRED szoftver által jósolt szerkezetben az első és második β -lemezen, illetve a 4. és 5. β -lemezt elválasztó rövid hurkon találjuk meg.

```

PredSS          aaaaaaaaaaaaaaaaaa
SC05461   1  MITTSLRRRTAAAVLSLSAVLATTAAATAPGAAPAPSAAPAKAAPACQFD   50

PredSS          aaa          bbbb bbbbbbb          aaa
SC05461   51  DRTKAAADRGVDVDRITPEPVWRTTCGTLYRSDSRGPQVVFEFGFHAQDV 100

PredSS          aaa          bbbbbbbbaaa bbbb bbbbbbb  bb
SC05461  101  QNGQYDVEKYVLVNQPSYVSTSYDHDLYKTWYKSGYNYVDAPGGIDVN 150

PredSS          bb          bbbb bbbbbbb          aaaaa
SC05461  151  KTIGDTHKWADQVEVAFPGGIQRKYIIGVCPVDRQTKTEIMSDCESNPY 200

PredSS
SC05461  201  QPWH

```

15. ábra. A SCO5461 fehérje SSPRED program szerinti feltételezett szekunder szekvenciája

A konzervált motívumokat tartalmazó szekvenciák fölötti, β -lemez szekunder struktúrát jelölő **b** betűk a 3-D modell (14. ábra) adott β -lemezeinek színével megegyező színűek. Az **a** szimbólum α -helikális másodlagos szerkezetet jelez.

7.2.3.3. Az N-terminális szignálszekvencia

A SCO5461 fehérjében a szignálszekvenciákat azonosító SignalP program (3.0 verziója) felismert egy N terminális, három részből álló, RRTAA motívumot tartalmazó szignál szekvenciát (1.– 42. aminosav), amely hasonlít az iker-arginin transzlokációs (twin-arginin translocation, azaz Tat) szignálhoz (Li és mtsai, 2005; Widdick és mtsai; 2006). Azonban a Tat szignálok azonosítására specializált programok – a TatFind és a TatP – egyike sem találta valódi Tat szignálnak az említett szakaszt. A SCO5461 protein N terminális szignál szekvenciája a Sec szekréciónak útjelző szignál peptidjével is mutat felületes hasonlóságot, de a c régió legvégén lévő pozitív töltésű lizin (K41) oldallánca Sec elkerülő szignálként funkcionál. (Li és mtsai, 2005).

Widdick és munkatársai az általuk közölt kísérletekben *Streptomyces*-ekből származó, feltételezett Tat szignálszekvenciákat teszteltek, hogy képesek-e a markerként használt agaráz enzimfehérje sejtéből való kiszállítására. Kísérleteik eredményéből kiderült, hogy a SCO5461 fehérje kis mennyiségben ugyan megtalálható a *S. coelicolor* sejt falában, de a SCO5461 gén N terminális szignálszekvenciája (16. ábra) nem valódi extracelluláris szekréciónak útjelző szignál. Ugyanis *in vivo* nem tette lehetővé a hozzá fuzionált agaráz enzim kiszállítását az extracelluláris térbe (Widdick és mtsai. 2006). Ez az eredmény arra utal, hogy a SCO5461 nem extracelluláris fehérje, valószínűbb, hogy egy transzmembrán fehérjét kódol a SCO5461 gén.

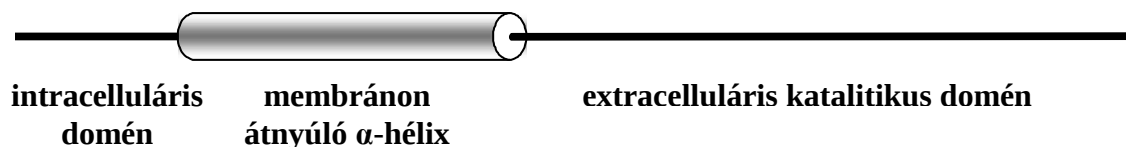


16. ábra. A SCO5461 fehérje N terminális szignálpeptidje és annak három régiója

A K41 aminosavat piros kerettel jelöltük.

A TMpred és SSPRED szoftverrel készített másodlagos szerkezet modellek egymással összhangban azt mutatják, hogy a SCO5461 egy transzmembrán fehérjét kódol. A fehérjének van egy rövid (9aa), N terminális intracelluláris doménje, egy 19 aminosavból álló, helikális transzmembrán doménje és egy 176 aminosavból álló, C terminális extracelluláris katalitikus doménje (17. ábra). Valószínűsíthető, hogy az életciklus stacioner fázisában a *S. coelicolor*

sejtek által szekretált proteáz enzimek aspecifikus hasítása következtében kerülhet SCO5461 fehérje a sejtfalba.



17. ábra. A SCO5461 fehérje feltételezett három doménje

7.3. A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* null mutáns elkészítése

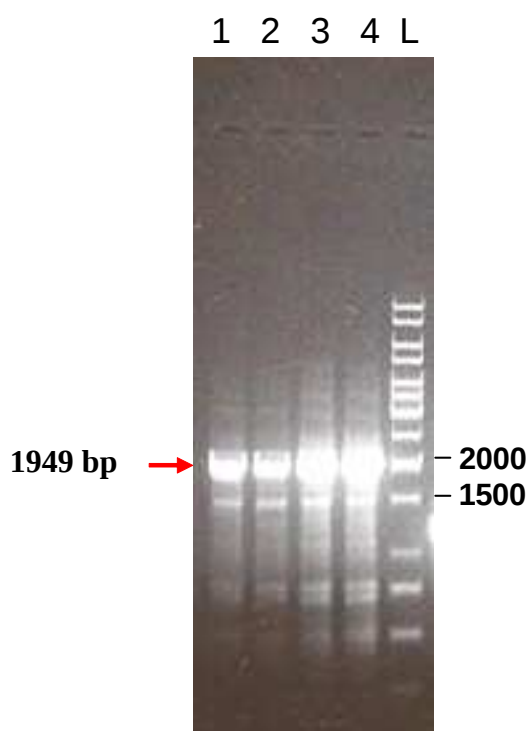
A SCO5461 gén *S. coelicolor*-ban betöltött biológiai szerepének vizsgálatára az un. „forward” genetikai módszert választottuk, azaz elkészítettük a *S. coelicolor* SCO5461 génre nézve null mutánsát és azt vizsgáltuk, hogy a géntermék hiánya okoz-e változást a fenotípusban, változik-e a morfológiai differenciálódás és az antibiotikum termelés a mutánsban.

A SCO5461 gén helyettesítéséhez egy apramycin rezisztencia gént és a konjugációt lehetővé tevő *oriT* régiót tartalmazó *apra-oriT* kazettát használtuk. Az *apra-oriT* kazetta elkészítéséhez *E. coli* DH5 α /pIJ773 törzsből izoláltuk a pIJ773 plazmidot. A plazmidot *Hind*III és *Eco*RI restrikciós endonukleázokkal emésztettük, az így kapott *apra-oriT* kazettát tartalmazó 1398 bp-os vektor szakaszt gélből izoláltuk és templátként használtuk az *apra-oriT* kazettát amplifikáló PCR reakcióban. A PCR reakcióhoz az 5461F és 5461R primereket használtuk, amelyek 5' végének 36 nukleotidnyi szakasza megegyezik a SCO5461 gén kódoló szakasza előtti (5') és utáni (3') genomi DNS szekvenciával. Az 1476 bp hosszúságú PCR terméket QIAGEN MinElute PCR Purification kittel megtisztítottuk. Ezt követően a SCO5461 gént tartalmazó St3D11 cosmidot transzformáltuk az *E. coli* BW25113/pIJ790 törzsbe. A lineáris PCR terméket (*apra-oriT* kazetta) *E. coli* BW25113/pIJ790/St3D11 törzsbe elektroporáltuk. A transzformánsokat kanamycint és apramycint tartalmazó LB táptalajon szelektáltuk. A kétszeresen rezisztens transzformánsokban lejátszódott a homológ rekombináció (kettős átkeresztződés), a cosmidon lévő SCO5461 gén kicserélődött az *apra-oriT* kazettára, létrejött a gént nem tartalmazó St3D11::*apr* cosmid.

Ennek bizonyítása érdekében több telepéből izoláltunk cosmidot és Str1 és Str2 primereket használva PCR-rel ellenőriztük, hogy tartalmazza-e a kazettát a cosmid. A megfelelő transzformánsok egyikéből nagyobb mennyiségben izoláltuk a St3D11::*apr*

cosmidot, amelyet azután a DNS metilációban mutáns *E. coli* ET12567/pUZ8002 törzsbe elektroporáltunk. Az apramycin rezisztens transzformánsok közül egyet használtunk a következő lépéshez.

Az apramycin rezisztens *E. coli* ET12567/pUZ8002 törzsből konjugációval juttattuk át az a St3D11::apr cosmidot a *S. coelicolor* M145 törzsbe. A homológ rekombináció eredményeként a *S. coelicolor* genomjának a SCO5461 gént tartalmazó része kicserélődik a St3D11::apr cosmid *apra-oriT* kazettát hordozó szakaszával. A kettős átkereszteződés eredményeként keletkező *S. coelicolor* exkonjugáns telepek kanamycinre érzékenyek, apramycinre viszont rezisztensek. Kiválogatásukhoz a 10 mM MgCl₂-ot tartalmazó SFM táptalajon kinőtt, apramycint és nalidixin savat tartalmazó oldattal felülrétegzett telepeket replikáztuk párhuzamosan csak apramycint ill apramycint és kanamycint együttesen tartalmazó LB táptalajra is. Összesen 345 telep volt apramycin rezisztens és kanamycin érzékeny. Az apramycinre rezisztens, kanamycinre érzékeny telepeket egyenként átoltottuk



18. ábra. Apramycin rezisztens, kanamycin érzékeny *S. coelicolor* exkonjugánsokból izolált genomi DNS ellenőrzése PCR-rel

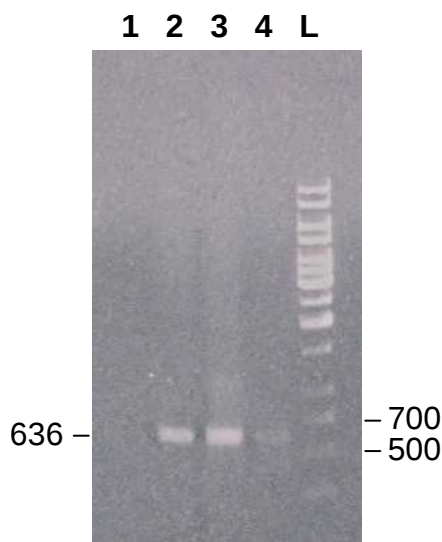
1, 2, 3, 4: Különböző apramycin rezisztens, kanamycin érzékeny *S. coelicolor* telepekből izolált genomi DNS-ről Str1-Str2 primerpárral felszaporított, a kazetta jelenlétét bizonyító, 1949 bp PCR termék. **L:** 1 kbp méretmarker.

apramycint tartalmazó SFM táptalajra, végül a kinőtt telepekkel újra elvégeztük az előbbi párhuzamos leoltásos ellenőrzést. 57 telep mutatkozott második ízben is apramycin rezisztensnek és egyben kanamycinre érzékenynek.

Hét, duplán ellenőrzött apramycin rezisztens, kanamycin érzékeny exkonjugánsból genomi DNS-t izoláltunk (Nicodinovic és mtsai, 2003). A kapott genomi DNS-t templátként használtuk az ellenőrző PCR reakcióban, amelyet ugyanazzal a primerpárral (Str1 és Str2) és ugyanolyan kondíciókkal végeztük, mint a cosmid kazetta-tartalmának ellenőrzésénél (18. ábra). Az *apra-oriT* kazetta méretének megfelelő nagyságú, 1949 bp-nyi PCR termékeket gélből izoláltuk és *XhoI* emésztéssel ellenőriztük. Az így szelektált és ellenőrzött *S. coelicolor* exkonjugánsok közül egyet kiválasztottunk, és azt *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns törzsnek neveztük el, ezt használtuk további vizsgálatainkban.

7.4. A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* null mutáns komplementálása

A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* törzs komplementálásához a kék-fehér szelekciót lehetővé tevő pWHM3 *E. coli*-*Streptomyces* ingázó plazmidba, a lacZ promoter mögé, *HindIII* és *EcoRI* hasító helyek közé klónoztuk a teljes vad allélt úgy, hogy az a promoterrel egy leolvasási keretbe essen. A *S. coelicolor* M145 genomiális DNS-éről a restriktációs enzimek hasító helyeit is tartalmazó 5461HindStart és 5461EcoStop primerekkel, PCR-rel felszaporított DNS-t PCR termék tisztító kittel tisztítottuk. Ezután, mint 636 bp-os PCR terméket, mind a pWHM3 plazmidot *EcoRI*-gyel és *HindIII*-mal emésztettük. Agaróz gélből izoláltuk a hasított termékeket, végül ligáltuk őket. A ligálás termékeként a pWH1 plazmid keletkezett. Az *E. coli* HB101 törzset elektroporálással transzformáltuk pWH1 plazmiddal. A transzformánsokat ampicillint, IPTG-t és X-gal-t tartalmazó LB táptalajra szélesztettük. A fehér telepekből plazmidot izoláltunk, majd a tisztított plazmidot gélelektroforézissel és *SmaI* ill. *EcoRI*-*HindIII* emésztéssel is ellenőriztük. PCR segítségével is meggyőződünk a ligálás sikeres voltáról. 5461HindStart és 5461EcoStop primerekkel felszaporítottuk a klónozott SCO5461 gént az izolált plazmidról. Pozitív kontrollként a St3D11 cosmidot, negatív kontrollként az üres pWHM3 plazmidot használtuk. A pWH1 plazmidról felszaporított, 636 bp hosszúságú PCR termék jelenléte bizonyítja a klónozás sikerességét (19. ábra).



19. ábra. A pWHM3 plazmid és a SCO5461 gén ligálásából származó pWH1 plazmid ellenőrzése PCR-rel

1: A negatív kontrollként használt pWHM3 templáttal nincs PCR termék. **2:** A pozitív kontroll St3D11 cosmid templáttal, **3:** az 1. miniprepből származó pWH1 templáttal és **4:** a 2. miniprepből származó pWH1 templáttal is 636 bp PCR terméket kaptunk, tehát sikeres volt a ligálás. **L:** 1 kbp létra.

A pWH1 plazmidot hagyományos módszerrel transzformáltuk a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* törzsbe, az így komplementált mutáns törzset *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1-nek neveztük el.

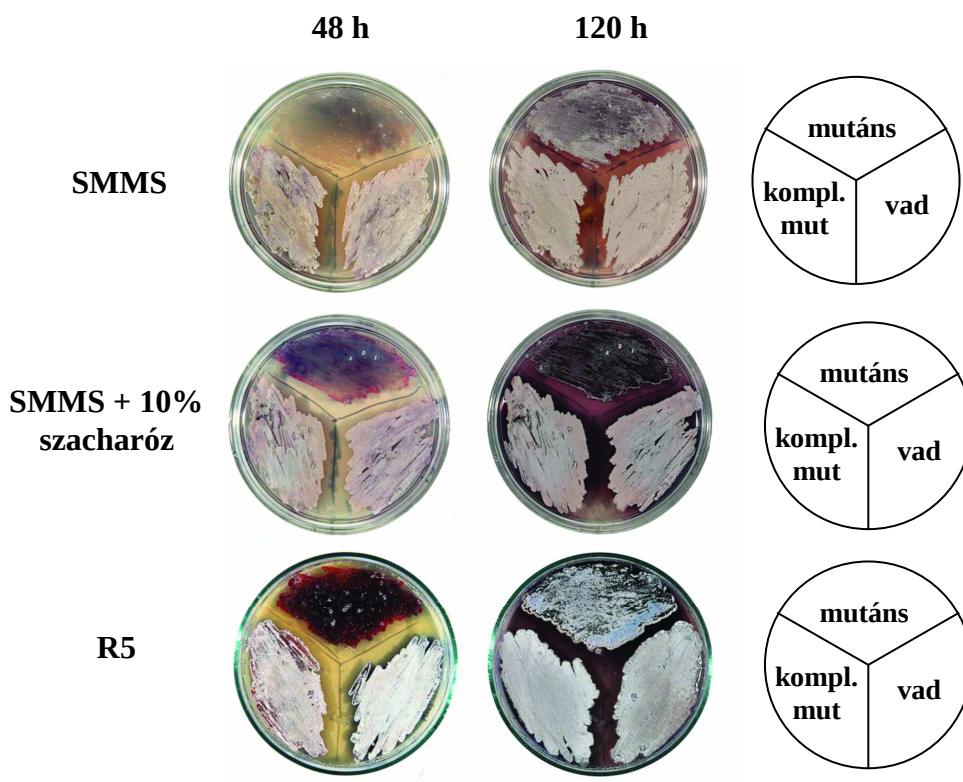
7.5. A *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns fenotípusának analízise

7.5.1. Morfológiai differenciálódás

A SCO5461 gén apramycin rezisztencia kazettával történt helyettesítése kondicionális pleiotróp fenotípust eredményezett. SFM táptalajon a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* null mutáns (továbbiakban a mutáns) fenotípusa azonos volt a *S. coelicolor* M145 vad törzsével (továbbiakban a vad vagy M145). Mivel a mutáns jól nőtt és spórázott ezen a táptalajon, ezért is használtuk ezt a táptalajt a spóraszuszpenzió elkészítéséhez. Irodalmi adatokból közismert, hogy egyes mutánsok fenotípusát befolyásolják a tenyésztési körülmények, ezért a vad törzs, a mutáns és a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1 (továbbiakban a komplementált mutáns) törzseket három különböző táptalajon – SMMS, SMMS+10% szacharóz (a továbbiakban SMMS+) és R5 – tenyésztettük és összehasonlítottuk

a törzsek morfológiai differenciálódását. Szilárd SMMS táptalajon a mutáns megkésett morfológiai differenciálódást mutatott a vadhoz és a komplementált mutánshoz viszonyítva. A mutáns 48 órás korú tenyésztete hasonlított a *bald* mutánsokéhoz, miközben a vad és a komplementált mutáns már légmicéliumot és spórákat képzett. 120 órás tenyészetek esetén már a mutánsnál is megjelent a légmicélium, de nem képzett olyan tömegű spórát, mint a másik két törzs (20. ábra).

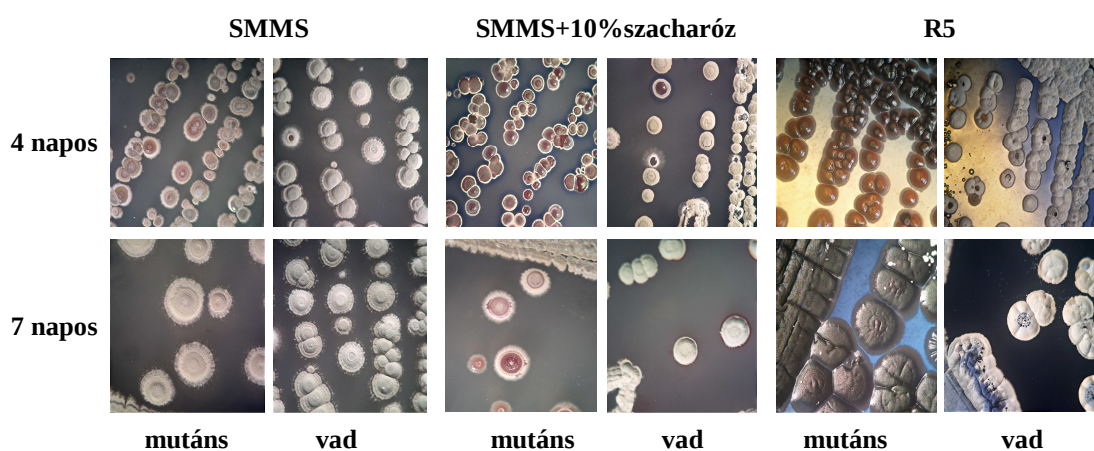
Az SMMS+ táptalajban lévő 10% szacharóz ozmotikus stresszt okoz, ami fokozta a mutáns és a vad törzs morfológiai differenciálódásában lévő különbséget. A mutáns tenyészet légmicélium képzése és a sporulációja később kezdődött. 120 órás korban még alig volt látható légmicélium a tenyészet felszínén (20. ábra), de az egy hetes tenyészet már bőségesen spórázott (nincs ábrázolva).



20. ábra. A mutáns törzs, a komplementált mutáns és a vad típusú M145 törzs fenotípusának összehasonlítása három különböző táptalajon tenyésztve

Az *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns, a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1 komplementált mutáns és a *S. coelicolor* M145 vad típusú törzseket egymás mellett tenyésztettük Petri csészében SMMS, SMMS+10% szacharóz és R5 táptalajon. 48 órás és 120 órás korukban ellenőriztük fenotípusaikat. A képek melletti sematikus rajzon jelöltük be az egyes törzsek helyzetét.

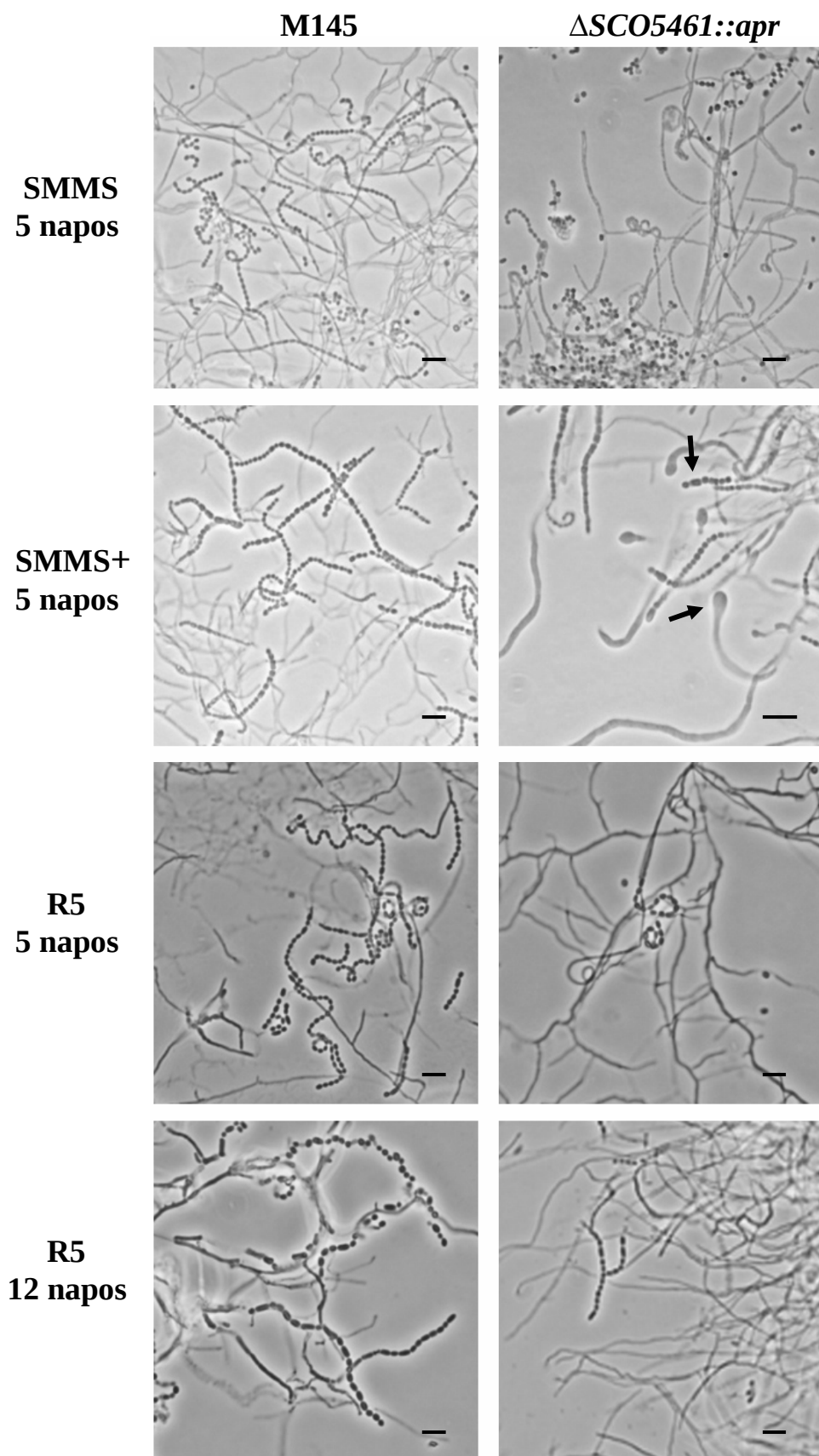
Érdekes módon a mutáns fenotípusát a tápanyagokban gazdag, ozmotikus stresszt okozó R5 táptalajon az is befolyásolta, hogy egyedül nőtt a Petri csészében vagy a vad és a komplementált mutáns mellett tenyésztettük. Az utóbbi esetben az SMMS táptalajon nőtt tenyésztetekhez volt hasonló a fenotípusa, azaz 48 órás korban még nem differenciálódott, de 120 órás korban már megjelent a légmicélium és sporulált is a tenyészet (20. ábra). Az önmagában növekedő mutáns tenyészetben még egy hetes korban is csak szórványos légmicélium képzést figyeltünk meg. A 7 napos mutáns felszíne [az idősebb, 12 napos tenyészeté is (nincs ábrázolva)] „kopasz”, a *bald* mutánsokéhoz hasonló megjelenésű volt, de a *bldA* mutánstól eltérően termelt actinorhodint (21. ábra).



21. ábra. Az *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns és a vad típusú M145 törzsek fenotípusa háromféle táptalajon, külön-külön Petri csészékben növesztve

Az egyedül tenyésztett mutáns fenotípusa hasonló volt SMMS+ táptalajon is, de ott a légmicélium képzés kicsit erőteljesebb volt 1 hetes korban (21. ábra). A külön Petri csészékben növekvő tenyészetek esetében tehát még kifejezettebben volt megfigyelhető, hogy a táptalajban lévő szacharóz kiváltotta ozmotikus stressz (SMMS+, R5) késleltette a morfológiai differenciálódást, de az SMMS+ táptalajon végül 1 hetes korban mégis csak létrehozott légmicéliumot és spórákat is a mutáns törzs.

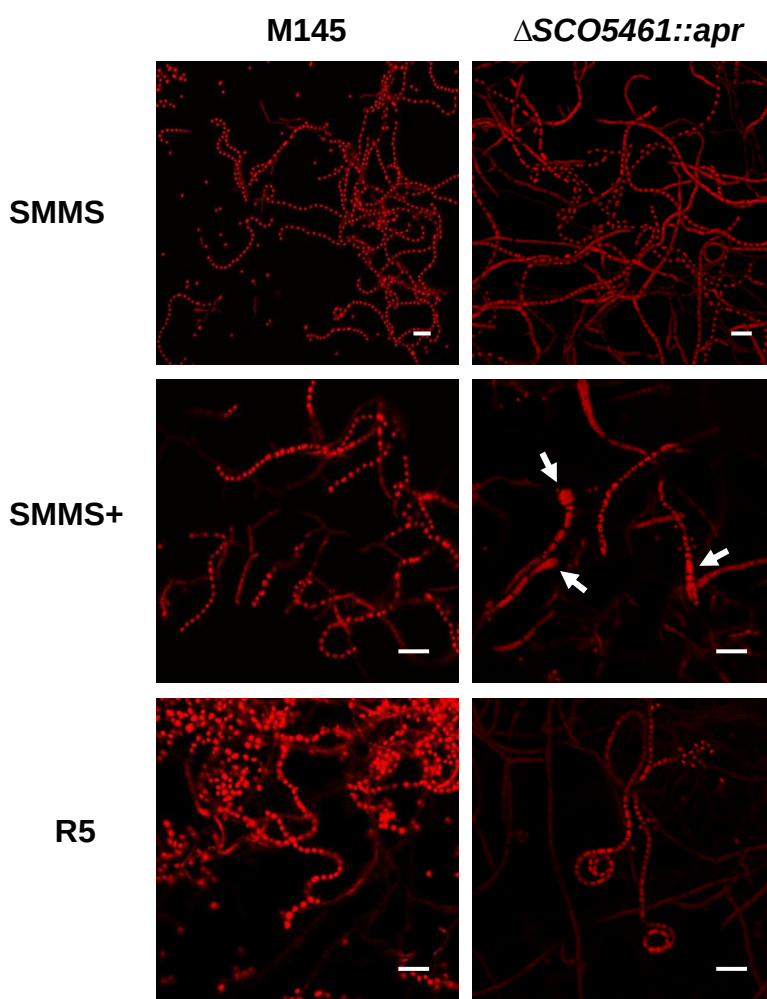
A mutáns mikroszkópos vizsgálata megerősítette a fent leírt fenotípusos jellemzőket. A fázis-kontraszt mikroszkópos vizsgálatokhoz agar lemezekbe beszúrt fedőlemezekre növesztettük rá a sejteket. A 22. ábrán látható, hogy SMMS táptalajon 5 napos tenyésztés után csavarodott légmicélium és spóraláncok figyelhetők meg a vad törzs mintájában. A mutáns mintájában is látható légmicélium és spóralánc, de a spóraláncok kevésbé szabályosak, sok a mintakészítés során levált spóra, ami arra utal, hogy a spórafal szerkezete különbözhet a



22. ábra. A vad típusú M145 és a mutáns tenyészetének fenotípusa fázis-kontraszt mikroszkóppal vizsgálva

A méretvonalak 10 μm -t jelentenek a képeken.

vadétól. A vad törzzsel összevetve látható, hogy a spórák mennyisége is kevesebb (22. ábra). A vad és mutáns közötti különbség még kifejezettebb SMMS+ táptalajon, ahol a vad törzs mintájában hosszú, egyenes spóraláncok találhatók. Hasonló láncok a mutáns mintájában is előfordulnak, de a spórák mérete változó és aberráns, egyenetlenül megduzzadt hifacsúcsokat és duzzadt spórákat is nagy számban láthatunk a mintában (nyilak is jelzik a 22. ábrán). Míg a vad törzs normális differenciálódást mutat, az R5-ön növesztett mutáns 5 napos mintájában alig található légmicélium vagy spóra, a nem differenciálódott vegetatív micélium dominál. Ez a fenotípus 12 napos tenyésztést követően sem változott lényegesen (22. ábra).



23. ábra. A vad típusú M145 és a mutáns 7 napos tenyészetének DNS tartalma konfokális mikroszkóppal vizsgálva

Nincs jellegzetes különbség a minták DNS tartalmában. A fehér nyilak a fázis-kontraszt mikroszkóppal is jól látható duzzadt hifacsúcsokat és abnormális spórákat jelölik. A méretvonalak 10 μm -t jelentenek a képeken.

A komplementált mutáns törzs fenotípusa mindegyik táptalajon tenyésztve megegyezett a vad törzs fenotípusával (nincs ábrázolva).

A fentebb említett három táptalajba állított fedőlemezekre növesztett vad és mutáns sejtek DNS tartalmát a tenyészetek 2 és 7 napos korában propídium-jodidos festést követően konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A DNS minden mintában kimutatható volt, még a mutáns SMMS+ táptalajon megfigyelhető duzzadt hifacsúcsaiban és a gyakran nagyobb méretű, duzzadt spórákat tartalmazó, abnormális spóraláncaiban is (nyilakkal jelölve az egy hetes mintákról készült képek egyikén a 23. ábrán).

7.5.2. Antibiotikum termelés és szekréció

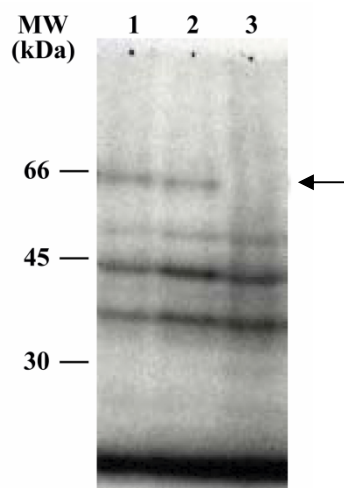
A *S. coelicolor* M145 vad típusú törzs és az M145 Δ SCO5461::*apr* mutáns actinorhodin termelését szilárd SMMS, SMMS+10% szacharóz, R5 táptalajon és folyékony SFM táptalajon is vizsgáltuk. Szilárd tenyészetek esetében ezúttal a táptalaj felszínére helyezett steril filterkorongra (Millipore, 0,1 nm Ø) oltottuk le a spórákat. Ez a tenyésztési mód lehetővé teszi, hogy összehasonlítsuk: (a) a fehér korongon növekedő tenyészetek színét (a színintenzitás arányos a micélium termelte antibiotikum mennyiségével); (b) a korong és a rajta növekedő micélium eltávolítása után (miután a sejtfonalak nem tudnak áthatolni a steril szűrőn és nem nőnek bele a táptalajba) az extracelluláris térbe kiválasztott antibiotikum mennyiségét. A 24. ábrán megfigyelhető, hogy R5 táptalajon már 3 napos korban sok antibiotikumot termel mind a vad, mind a mutáns tenyészet (a tenyészetek színe kék). 7 napos korban a mutáns jelentősen több antibiotikumot termel és szekretál, ami a szűrő eltávolítása után jól látható. A másik két táptalajon éppen ellentétesen változott a törzsek antibiotikum termelése. A vadhoz képest a mutáns termelt kevesebb actinorhodint, főleg az SMMS táptalajon, ahol egyáltalán nem is szekretálta azt a táptalajba. Az 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 utalhat (24. ábra).

Az antibiotikum termelés pontos méréséhez az actinorhodin termelésre legalkalmasabb, folyékony SFM táptalajban növesztettük 4 napig, 30°C-on a mutáns és a vad törzset. A 4 napos tenyészetből a micélium kicentrifugálása után a felülúszóból határoztuk meg az extracelluláris γ -actinorhodin mennyiségét. A vad típusú M145 törzs termelte a legtöbb

tartalmazott a micélium actinorhodint, azaz a mutáns is termelt antibiotikumot, de nem választotta ki azt az extracelluláris térbe.

7.5.3. ADP-riboszilált fehérje-mintázat

A vad *S. coelicolor* M145 törzset celofánnal borított R5 táptalajon, a mutáns és komplementált mutáns törzset apramycin tartalmú, szintén celofánnal borított R5 táptalajon tenyésztettük 30°C-on. 32 órás tenyészetek micéliumaiból sejt kivonatot készítettünk és a fehérjék ADP-riboszilációját radioaktívan jelölt szubsztráttal, β [adenil- ^{32}P]NAD $^{+}$ -dal 30°C-on 30 percig végeztük. Az ADP-riboszilációs reakciót követően a minták fehérjéit TCA-val kicsaptuk, TCA-val és dietil-éterrel többször mostuk, végül SDS-sel kiegészített elektroforézis mintapufferben 5 percig forraltuk és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, hogy a fehérjék tökéletesen visszaoldódjanak. Az SDS-PAGE futtatást megelőzően a mintákat 90°C-on 5 percig újra felmelegítettük. A fehérjéket állandó 200 V feszültséggel futtatva 13%-os szeparáló gél és 5%-os tömörítő gél felhasználásával készült SDS-PAGE-en választottuk szét. Az SDS-PAGE elválasztást követően a gél Immobilon P transzfer membránra blottoltuk



26. ábra Az *S. coelicolor* M145 vad törzs (1. minta), az *S. coelicolor* M145 $\Delta\text{SCO5461}::\text{apr}/\text{pWH1}$ komplementált mutáns törzs (2. minta) és az *S. coelicolor* M145 $\Delta\text{SCO5461}::\text{apr}$ mutáns törzs (3. minta) radioaktívan jelölt ADP-riboszilált fehérjeinek mintázata

Az ábra bal oldalán a molekulatömeg standard fehérjék pozíciója van jelölve (MW minta). A nyíl a vad és a komplementált mutáns törzs mintáiban megtalálható ADP-riboszilált fehérje hiányát mutatja a mutáns mintájában.

semi-dry módszerrel. A blottot levegőn hagytuk száradni, majd kazettába tettük és egy éjszakás exponálás után MolecularDynamics PhosphorImager SI készülék segítségével detektáltuk a radioaktívan jelölt ADP-ribosilált fehérjéket. A 26. ábrán látható radiogrammon nyíllal jelölt pozícióban eltérést találtunk a vad törzs, a komplementált mutáns és a mutáns törzs ADP-ribosilált fehérje mintázatában. Egy ~65 kDa méretű ADP-ribosilált fehérje hiányzik a mutáns mintájából, de a komplementálás hatására újra megjelent a komplementált mutáns törzsben.

8. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A fehérjék mono-ADP-ribozilációját katalizáló enzimek közül elsőként a betegségeket okozó, emlős sejtek fehérjéire ható bakteriális toxinokat ismerték fel. A toxinokhoz hasonló szerkezetű, endogén mono-ADP-riboziltranszferáz (ADPRT) enzimeket azóta kimutattak már pro-, és eukarióta sejtekben is (Hayaishi és Ueda, 1985; Brünne és Lapetina, 1989; Lowery és Ludden, 1990; Ludden, 1994; Okazaki és Moss, 1996; Okazaki és Moss, 1999; Devezé-Alvarez és mtsai, 2001; Corda és Di Girolamo, 2003, Di Girolamo és mtsai, 2005; Di Paola és mtsai, 2012). Az ADPRT katalizálta fehérje módosítást a mono-ADP-ribóz-fehérje glikohidroláz (MARH) enzimek teszik reverzibilissé. Az ilyen ADP-ribozilációs szabályozó ciklusban részt vevő ADPRT/MARH enzimpárok közül legismertebb és fiziológiai funkcióját tekintve is a legrészletesebben jellemzett a fotoszintetizáló és nitrogén-fixálásra is képes *Rhodospirillum rubrum*-ban lévő két enzim. Ebben a baktériumban az ADP-ribozilálást végző DRAT és az ADP-ribózt eltávolító DRAG a nitrogén fixálás kulcs enzime, a dinitrogén reduktáz aktivitására hatva szabályozza a nitrogén asszimilációt (Ludden, 1994). Általánosságban azonban kijelenthetjük, hogy prokarióta organizmusokban kevés ismeret áll rendelkezésre a fehérjék mono-ADP-ribozilációjának biológiai szerepéről.

Munkacsoportunk korábban már kimutatott ADP-ribozilált fehérjéket és ADPRT aktivitást *Streptomyces griseus*-ban és *S. coelicolor*-ban is (Barabás és mtsai, 1986; Barabás és mtsai, 1988; Shima és mtsai, 1996). Agmatint használva target molekulaként sikerült bizonyítani arginin-specifikus ADPRT meglétét *S. griseus*-ban (Penyige és mtsai, 1990), de hosszú ideig nem voltak pontos molekuláris ismereteink sem az ADP-ribozilált fehérjékről, sem a módosítást katalizáló enzimekről. A *S. coelicolor*-ban a reverzibilis protein ADP-riboziláció/de-ADP-ribozilációs ciklus jelenlétére utal az a tény is, hogy *S. coelicolor* genomjában legalább hat, az ismert MARH enzimekkel nagymértékű szekvencia homológiát mutató gén található (*SCO0086*, *SCO1766*, *SCO2028*, *SCO2030*, *SCO4435*, *SCO5809*; saját szekvencia analízis). Az is ismert, hogy az *S. coelicolor* genomban megtalálható egy *Mycobacterium*-ban azonosított, rifampicin ADPRT ortológ, az Arr-sc (*SCO2860*) gén. Nem kizárt, hogy a gén terméke képes fehérjék ADP-ribozilációjára is (Baysarowich és mtsai, 2008).

A mono-ADP-riboziláció sejtben betöltött funkciójának megértéséhez a *S. coelicolor*-ral folytatott jelen munkánk során célul tűztük ki, hogy (1) azonosítsuk a sejtben endogén úton ADP-ribozilált fehérjéket; (2) szekvencia homológia alapján próbáljunk meg azonosítani még ismeretlen ADPRT enzimet kódoló gént; továbbá (3) 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.

8.1. Az *in vitro* ADP-ribózilációs reakció optimális feltételeinek beállítása

Az *S. coelicolor* sejtkivonatához radioaktívan jelölt [^{32}P]-NAD $^{+}$ -ot adva szubsztrátként kimutattuk, hogy a fehérjékbe történő ADP-ribóz beépülés 30 percnél éri el maximumát, ezután csökken. Ennek a csökkenésnek valószínűleg az az oka, hogy a sejtkivonat NADGH aktivitása elbontja a NAD $^{+}$ -ot és a poszttranszlációs modifikációt reverzibilissé tevő MARH aktivitás pedig lehasítja az ADP-ribózt a fehérjékről. Feleslegben adott, nem jelölt ADP-ribózt adva a reakcióhoz növelni tudtuk az ADP-ribóz fehérjékbe történő beépülését. Valószínűleg a MARH aktivitás gátlása következtében emelkedett az ADP-ribóz beépülés (a NADGH-t nem gátolja az ADP-ribóz; Penyige A. személyes közlése). A nagy főlöszlegben lévő „hideg” ADP-ribóz csökkenti a reakcióelegyben jelenlévő, a radioaktív NAD $^{+}$ bontásából származó [^{32}P]-ADP-ribóz nem enzimátikus úton fehérjékbe történő beépülését is, lehetővé téve azt, hogy valóban csak az ADPRT enzimek katalizálta fehérje ADP-ribózilációt mérjük a kísérletben. Az ADP-ribózilált fehérjék hidrolíziséből származó nukleotidokat HPLC-vel elválasztva kimutattuk, hogy valóban ADP-ribóz csoporttal módosultak a fehérjék.

8.2. A vad típusú törzs ADP-ribózilált fehérjéinek izolálása és azonosítása

A *S. coelicolor*-ban található ADP-ribózilált fehérjék izolálásához m-aminofenilboronsav affinitás kromatográfiát, 2-D SDS-PAGE elektroforézist és a gélben tripszinnel való emésztést követő MALDI-TOF tömegspektrometriás peptid analízist használtunk. Nyolc fehérjét sikerült egyértelműen azonosítanunk a *S. coelicolor* ADP-ribózilált fehérjéi közül. Eredményeink azt mutatták, hogy néhány fehérje több, általában eltérő pI értékű foltban is kimutatható volt a 2-D-gélen. A több foltot is elfoglaló fehérjéket két csoportba lehet osztani. A SCO5477 (az 1. számmal jelölt keret) 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 második csoportba tartozó fehérjék két foltban voltak megtalálhatóak a 2-D gélen. Mindkét fehérje esetében (4. és 5. folt: SCO4771; 7. és 8. folt: SCO4824) az egyik izoforma móltömege és pI-ja a natív fehérjére jellemző értéknek felel meg, míg a másik változat azonos

molekulatömeggel, de alacsonyabb izoelektromos ponttal rendelkeznek. A pI értékének savasabb tartományba való eltolódását okozhatja egyfelől valamilyen poszttranszlációs fehérje módosítás, mint az ADP-ribóziláció, ahol két negatívan töltött foszforsav maradék kapcsolódik a fehérjéhez (Rieul és mtsai, 1987). A SCO5477 esetében a több eltérő izoforma létrejöttét ADP-ribóziláció mellett az Asp és Gln spontán dezamidációja is eredményezheti (Zomber és mtsai, 2005).

A nyolc azonosított fehérjét három csoportba sorolhatjuk a feltételezett vagy ismert élettani szerepük alapján, így megkülönböztethetünk (1) szekretált fehérjéket, (2) dehidrogenáz enzimeket és (3) egyéb fehérjéket. Az általunk talált négy ADP-ribóziláló 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-ribózilált fehérjeként már kimutatta Ochi és munkacsoportja is (Sugawara és mtsai, 2002). A fehérje ADP-ribóziláló ciszteinje azonos azzal a ciszteinnel, amely minden leendő lipoproteinben a transzlokációhoz szükséges szignálszekvenciában, annak lipobox részében található (Rahman és mtsai, 2008) és amelynek szulfhidril csoportjához a lipoprotein diacilglicerol transzferáz egy lipid molekulát kapcsolva a membránhoz rögzíti az érett, a cisztein melletti hasítás miatt szignálpeptidet már nem tartalmazó lipoproteint (Hutchings és mtsai, 2009). Sugawaráék azt feltételezték, hogy ha ez a Cys oldallánc ADP-ribózilálódik, akkor valószínűleg nem szekretálódik az éretlen fehérje és így a lipoprotein diacilglicerol transzferáz enzim nem kapcsolhat hozzá lipidet. Az ADP-ribóziláció tehát egyrészt megakadályozná a fehérje kijutását a külső membránfelé, másrészt annak lipid molekulán keresztüli membránhoz rögzülését is gátolná, tehát a citoplazmában maradó ADP-ribózilált fehérje nem képes a transzportfolyamatokban ellátni a szerepét (Sugawara és mtsai, 2002). 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-ribózilált protein (Piette és mtsai, 2005). Az a tény, hogy mi ADP-ribózilált 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 (Haar és mtsai, 1997). Mivel az ADP-ribózilált FusH-t is a citoplazma kivonatból izoláltuk, intracelluláris lokalizációja arra enged következtetni, hogy a fehérje ADP-ribózilációja 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 glicerín-3-foszfáttá hidrolizálja (Antelmann és mtsai, 2000). Miután az eddig megismert példák arra utalnak, hogy az ADP-riboziláció inaktiválja a módosított fehérjét, az enzim reverzibilis ADP-ribozilációja a sejt glicerín felhasználását 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, amely egy inozin-5'-monofoszfát dehidrogenáz enzim (IMPDH) *S. coelicolor*-ban. 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 (Ochi, 1987; Inaoka és Ochi, 2002). A dehidrogenázok csoportjának másik fehérjéje a SCO4824 által kódolt FOLD, amely a tetrahidrofolát anyagcsere kettős funkciót ellátó enzime, metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz és metilén-tetrahidrofolát ciklohidroláz is egyben. Az enzim általunk ADP-riboziláltnak azonosított GAEEVVVGR peptid fragmentuma az evolúciósan erősen konzervált NADP⁺-kötő motívum része (Allaire és mtsai, 1998). 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 SCO4771 és a SCO4824 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 2-D-gélen. A két forma együttes jelenlétének fontos következménye lehet, hogy a multimer aktivitását a komplexet alkotó ADP-ribozilált és a módosítatlan alegységek közti arány befolyásolja. Az alkotóelemek egyedi módosíthatóságától való aktivitás-függés az enzim aktivitásnak egyfajta finomhangolását 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 (Okano és mtsai, 2010).

A harmadik csoportba két fehérje tartozik. Az egyik az éhezésre érzékenyítő SCO7629 kódolta SpaA protein. A SpaA fehérje az *E. coli*-ban a stacionális fázis szabályozásában szerepet játszó RspA fehérjével homológ (Huisman és Kolter, 1994). Korábban már kiderült, hogy a SCO7629 gén megszakítása *Streptomyces*-ekben kondicionális, sejtsűrűségtől függő

fenotípust eredményez. A mutáns tenyésztése nagy sejtsűrűség esetén minimál táptalajon később kezd antibiotikumot termelni, ugyanakkor nagyobb mennyiséget termel, mint a vad (Schneider és Chater, 1996). 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 (Lowery és Ludden, 1990; Woehle és mtsai, 1990). *S. coelicolor*-ban is kimutatták a fehérje konzervált Tyr-397 oldalláncának adenililálódását (Hesketh és mtsai, 2002). Fontos megjegyeznünk, hogy munkacsoportunk korábban *S. griseus*-ban már kimutatta a GlnA *in vitro* ADP-ribozilációját ami inaktiválta a glutamin szintetáz aktivitását (Penyige és mtsai, 1994). *Rhodospirillum rubrum*-ban és később *Synechocystis* fajokban is leírták ezt a módosítást (Woehle és mtsai, 1990; Silmann és mtsai, 1995). 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 (Piette és mtsai, 2005) 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 szolgálhatnak a fehérjék ADP-ribozilációja és a morfológiai differenciálódás között korábban általunk feltételezett kapcsolatra (Penyige és mtsai, 1990, 1996; Shima és mtsai, 1996).

8.3. ADPRT enzimet kódoló gén azonosítása szekvenciahomológiák alapján és a szekvencia *in silico* elemzése

Harmadik célkitűzésünk egy ADPRT enzim génjében mutáns törzs elkészítése és fenotípusos vizsgálata volt. Ehhez először azonosítanunk kellett ADPRT enzimeket kódoló géneket. Kézenfekvő megoldás lett volna a *Mycobacterium smegmatis*-ban lévő rifampicin ADP-riboziltranszferázzal nagyfokú homológiát mutató Arr-sc fehérjét kódoló SCO2860 gén megszakítása, de a gén elhelyezkedése a kromoszómán technikailag nagyon megnehezíti ezt a kísérletet (Baysarowich és mtsai, 2008).

Ezért először bioinformatikai módszerekkel próbáltunk olyan géneket azonosítani a megszekvenált *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomban, 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* törzsekén 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 glutaminsavat is tartalmazó ún. ARTT hurokban található Q/E-X-E 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 E-X-E ez a szekvencia (Nagahama és mtsai, 2000), míg a SCO5461-ben Q-X-E ez a motívum. Ilyen szekvencia 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 (E-X-E) esszenciális a szubsztrát kötéséhez. Mivel aszparagint és ciszteint ADP-riboziláló toxinoknál, sőt DNS-t ADP-riboziláló enzimnél is Q-X-E 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 ortológjai 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 törzsben 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 (Baysarowich és mtsai, 2008).

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 szekréciójára (Widdick és mtsai, 2006). A gén szignálszekvenciája a Sec szekréciós útvonal szignál peptidjével is mutat hasonlóságot, de a SCO5461 szignálszekvencia C régiójának legvégén lévő pozitív töltésű lizin (K41) oldallánc Sec elkerülő szignálként funkcionál (Li és mtsai, 2005). 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.

8.4. Az általunk azonosított ADPRT gén eliminálása a *S. coelicolor* genomból

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

8.5. A létrehozott null mutáns fenotípusának elemzése

Mivel közismert, hogy egyes, a morfológiai differenciálódásban érintett mutánsok fenotípusát befolyásolják a tenyésztési körülmények, ezért négy különböző szilárd táptalajon – SFM, SMMS, SMMS+10% szacharóz (a továbbiakban 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, de az SMMS minimál

táptalajon a mutáns megkésett morfológiai differenciálódást mutatott a vadhoz képest. Míg a vad törzs normális spóráképzést mutatott, a mutáns 48 órás korú tenyészetében légmicéliummentes, *bald* mutánsokra emlékeztető borszerű volt mutáns telepek felszíne. A 120 órás tenyészetben azonban 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 10% szacharózt tartalmazó 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 viszont nem spórázott a mutáns, ha egyedül nőtt a Petri csésze felszínén. Telepeinek felületén még 7-, sőt 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 viszont extracellulárisan komplementálhatónak bizonyult. Ha a mutánst a vad törzzsel együtt növesztettük R5 táptalajon, akkor, ha megkésve is, de sporulált a mutáns. 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 olyan táptalajra oltottuk le a mutáns tenyészetet, amelyet a vad törzs már előzőleg használt, azaz már eltávolítottuk a celofánon növesztett tenyészetét, de a sejtek által szekretált diffúzibilis faktorok a táptalajban maradtak, akkor is megfigyelhető volt a mutáns spóra képzése R5 táptalajon. Ez a jelenség arra utal, hogy a légmicélium képzéshez szükséges diffúzibilis faktorok (Classen és mtsai, 2006) közül egy vagy több termelésére vagy szekréciójára hatással lehet a *SCO5461* gén megszakítása.

A Petri csészékben növekvő tenyészeteken szabad szemmel megfigyelhető fenotípusos változásokat mikroszkóposan is nyomon követtük a táptalajokba szúrt 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, de a spórák mérete sok esetben jelentősen eltért egymástól, sőt gyakran előfordult az is, hogy a spórák és hifacsúcsok 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 5-, sőt 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 semmilyen különbséget a különféle táptalajokon nőtt törzsek micéliumában a DNS elhelyezkedésében.

A Δ SCO5461::apr mutáns antibiotikum termelését is vizsgáltuk szilárd és folyékony táptalajokon. A Petri csészében lévő szilárd táptalaj felszínére helyezett fehér 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. A 3 napos tenyészetek még összemérhető mennyiségű actinorhodint termeltek. 7 naposan a mutáns már jelentősen több antibiotikumot termelt és szekretált a vadnál. Minimál táptalajokon, azaz az SMMS és SMMS+ táptalajon növesztett tenyészeteknél az R5-ön megfigyelthez képest ellentétes tendenciát figyeltünk meg, mivel a vad törzs tenyészetéhez képest a mutáns törzs 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 tápanyagellátottság ozmotikus stresszel kombinálva viszont a megrekedt morfológiai differenciálódás, a spórázás hiánya mellett az antibiotikum túltermelését és erőteljesebb szekrécióját váltja ki.

A *S. coelicolor* nem differenciálódik folyékony táptalajon, antibiotikumot viszont termel. A törzsek által termelt extracelluláris γ -actinorhodin pontos mennyiségének meghatározásához az erre a célra leggyakrabban használt folyékony SFM táptalajon tenyésztettük a vad- és mutáns törzseket (annak ellenére, hogy szilárd SFM táptalajon nem

tapasztaltunk eltérést a mutáns és a vad törzs fenotípusában). Bár a két tenyészet micéliumának kék színe azt jelezte, hogy az actinorhodin termelése normális módon zajlik mindkét törzsben, a minták lecentrifugálása után láthatóvá vált, hogy 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. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy az actinorhodin transzportjáért felelős fehérjék egy részének aktivitását bizonyos körülmények között közvetett vagy talán közvetlen módon a SCO5461 által katalizált ADP-riboziláció befolyásolja. A *S. coelicolor* M145-ből általunk izolált és MALDI-TOF analízissel azonosított ADP-ribozilált fehérjék között azonban nem találtunk olyat, amelyet egyértelműen kapcsolatba lehetne hozni az antibiotikum szekréció mechanizmusával.

8.6. A null mutáns törzs komplementálása

A teljes, genomiális SCO5461 gént plazmidon (pWH1) bejuttatva komplementáltuk a mutáns törzset. A komplementáláshoz használt gént *in frame* klónoztuk a pWHM3 plazmidon elhelyezkedő gyenge lacZ promoter mögé, így a *S. coelicolor* Δ SCO5461::*apr*/pWH1 komplementált mutáns törzsben a SCO5461 fehérje termelődött, de nem expresszáldott nagy-mértékben. A komplementált mutáns szemmel és mikroszkóppal megvizsgálva is minden táptalajon azonos fenotípust mutatott, mint az M145 vad típusú törzs, tehát a null mutáns vadtól eltérő fenotípusos jellegeiért a SCO5461 fehérje hiánya, azaz a szubsztrát(ok) mono-ADP-ribozilációjának elmaradása tehető felelőssé.

8.7. A SCO5461 fehérje ADPRT aktivitásának bizonyítása

Funkcionálisan is igazoltuk, hogy a SCO5461 fehérje ADPRT aktivitással rendelkezik. A Δ SCO5461::*apr* mutáns-, a vad- és a komplementált törzs ADP-ribozilált fehérjei mintázatának összehasonlítása igazolta, hogy a SCO5461 gén 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 törzs mintájában. Ez a mutáns törzs komplementálásának sikerességét is bizonyítja.

Az általunk megszakított SCO5461 gén tehát nagy valószínűséggel egy mono-ADP-riboziltranszferáz enzimet kódol. Ezt a feltételezésünket egy néhány hete megjelent közlemény is igazolja. Nakano és mtsai – a pierisinekkal dolgozó munkacsoport –

megklónozták a SCO5461 fehérje katalitikus doménjét és *in vitro* kimutatták annak ADP-riboziltranszferáz aktivitását. Kísérleti rendszerükből következően guanin vagy deoxiguanin tartalmú nukleotidokat, oligonukleotidokat és élesztő tRNS-t használtak akceptorként az ADPRT aktivitás kimutatásához. Fehérjék ADP-ribozilációját nem vizsgálták (Nakano és mtsai, 2013).

A MALDI-TOF analízissel általunk azonosított nyolc ADP-ribozilált fehérje közül egy – a SCO5477 gén kódolta ligandot kötő ABC-transzporter alegység – a mutánsból hiányzó fehérjéhez hasonló molekulatömegű, ezért elképzelhető, hogy valóban ezt a fehérjét módosítja a membránhoz rögzült SCO5461 enzim. 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 enzim is jelen lehet a *S. coelicolor* sejtjeiben.

8.8. Eredményeink rövid összefoglalása

- 1) Nyolc ADP-ribozilált fehérjét azonosítottunk a *S. coelicolor*-ból, amelyekből kettő esetében már korábban feltételezték ezt a poszttranszlációs módosítást, hatot pedig mi írtunk le először ADP-ribozilált fehérjeként.
- 2) Azonosítottuk az eddig nem ismert ADPRT enzim, a SCO5461 génjét a *S. coelicolor* genomjában.
- 3) Elkészítettük a SCO5461 génre nézve null mutáns *S. coelicolor* törzset.
- 4) A gén megszakítása kondicionális pleiotróp fenotípust eredményezett. A mutáns fenotípusának elemzése arra enged következtetni, hogy *Streptomyces*-ekben a mono-ADP-riboziláció és a differenciálódás között valóban kapcsolat van, mint ahogy azt már korábban feltételeztük.
- 5) Kimutattuk, hogy SCO5461 fehérje egy ADPRT enzim, amelyre szükség van folyékony tápközegben az actinorhodin szekréciójához, és amely részt vesz a morfológiai differenciálódás szabályozásában, főleg (ozmotikus) stresszt okozó körülmények között.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérjék-mono-ADP-ribozilációja egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás, amelyet a mono-ADP-riboziltranszferáz (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 előállítása. 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 affinitás kromatográfiás 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*) különböző táptalajokon normális vagy megkésett differenciálódást mutatott vagy nem is sporulált. A genomiális gén plazmidon való bejuttatásával komplementáltuk a mutánst, ezáltal annak kondicionális pleiotróp fenotípusa visszaváltozott a vad törzsre jellemzőre. A vad törzs, a null mutáns és a *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1 komplementált mutáns törzs 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 tápközegben és különféle szilárd táptalajokon eltért a mutáns actinorhodin termelésének mennyisége és az antibiotikum szekréciójának mértéke. Mindezekből arra következtettünk, hogy a SCO5461 egy ADPRT enzim, amely *S. coelicolor* differenciálódására és az antibiotikum termelésére, szekréciójára hat.

10. SUMMARY

The protein ADP-ribosylation is a reversible posttranslational modification catalysed by mono-ADP-ribosyltransferases (ADPRT). Our aim was to isolate, and identify ADP-ribosylated proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2), which is an antibiotic-producing bacterial strain with complex morphology, and differentiation. Also, we wanted to find new potential ADPRT enzyme coding genes in the genome of *S. coelicolor* using sequence homology search and to prepare an ADPRT null mutant *S. coelicolor* strain. We planned to study the biological function of protein ADP-ribosylation in *S. coelicolor* by analysing the phenotype of the null mutant strain.

First, proteins in the crude cytoplasm extract of wild type *S. coelicolor* were *in vitro* ADP-ribosylated. After optimisation of the reaction conditions ADP-ribosylated proteins were purified by m-aminophenylboronate affinity chromatography from crude extract of 36 hours *S. coelicolor* M145 cells cultivated on SFM medium. Samples were loaded onto 2-D SDS-PA gel. The separated proteins were in gel digested with trypsin, and the pattern of digested fragments were analysed by MALDI-TOF. Eight ADP-ribosylated proteins were identified using this method: SCO5477, SCO2198, SCO2008, SCO4771, SCO1968, SCO4824, SCO6108, and SCO7629. Six of the proteins were newly identified as ADP-ribosylated proteins, in two cases we have confirmed previous results in literature.

In silico analysis of the *S. coelicolor* genome revealed a hypothetic ADPRT coding gene, the SCO5461. This SCO5461 gene was replaced by an apramycin resistance cassette. The generated null mutant – *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr* – strain had a pleiotropic, conditional phenotype. The mutation delayed or completely inhibited the morphological differentiation and antibiotic production and secretion of the strain, depending on culture condities. The mutant was complemented with the introduction of a wild type gene carrying plasmid. The comparison of the pattern of ADP-ribosylated proteins of the wild-type, the null mutant, and the *S. coelicolor* M145 Δ SCO5461::*apr*/pWH1 complemented null mutant strains revealed, that an ADP-ribosylated protein with a molecular weight of ~65 kDa was missing from pattern of the mutant strain. This protein, however reappeared in the complemented strain. So, we concluded that the SCO5461 is an ADPRT enzyme which is involved in the regulation of differentiation, antibiotic production and secrecion of *S. coelicolor*.

11. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Aktories K, Bärmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH, Habermann E (1986) Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature*. **322**: 390-392.
2. Allaire M, MacKenzie RE, Cygler M (1998) The 3-D structure of a folate-dependent dehydrogenase/cyclohydrolase bifunctional enzyme 1.5 Å resolution. *Structure* **6**: 173-182.
3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**: 3389-3402.
4. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-893.
5. Antelmann H, Scharf C, Hecker M (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* **182**: 4478-4490.
6. Barabás Gy, Penyige A, Szabó I, Ensign JC (1986) ADP-ribosylation in *Streptomyces griseus*. In *Biological, biochemical and biomedical aspects of Actinomycetes*. pp. 827-829. Edited by Szabó G, Biró S, Goodfellow M. Publishing House Hung. Acad. Sci., Budapest.
7. Barabás Gy, Penyige A, Szabó I, Barabás J, Ensign JC (1988) Post-translational protein modification in *Streptomyces*. In *Biol. Actinomycetes*. pp. 439-444. Edited by Okami Y, Beppu T, Okanishi M, Ogawara H. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
8. Baysarowich J, Koteva K, Hughes DW, Ejim L, Griffiths E, Zhang K, Junop M, Wright GD (2008) Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 4886-4891.
9. Bazan JF és Koch-Nolte F (1997) Sequence and structural links between distant ADP-ribosyltransferase families. In *ADP-ribosylation in animal tissues: Structure, function, and biology of mono(ADP-ribosyl) transferases and related enzymes*. pp. 99-107. Edited by Haag F and Koch-Nolte F. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp, New York, USA
10. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
11. Bérdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **58**: 1-26.
12. Berks BC, Sargent F, De Leeuw E, Hinsley AP, Stanley NR, Jack RL és mtsai (2000) A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**: 325-330.
13. Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothaft H, Saier MH, Titgemeyer F (2004) *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **186**: 1362-1373.
14. Bibb M (1996) 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142**: 1335-1344.

15. Bishop A, Fielding S, Dyson P, Herron P (2004) Systematic insertion mutagenesis of a streptomycete genom: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genom Res.* **14**: 893-900.
16. Bisse E és Wieland H (1992) Coupling of m-aminophenyboronic acid to S-triazine-activated Sephacryl: use in the affinity chromatography of glycated hemoglobins. *J. Chromatogr.* **575**: 223-228.
17. Bornancin F, Franco M, Bigay J, Chabre M (1992) Functional modifications of transducin induced by cholera or pertussis-toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Eur. J. Biochem.* **210**: 33-44.
18. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
19. Brüne B és Lapetina EG (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.* **264**: 8455-8458.
20. Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L (1996) Production of actinorhodin-related „blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**: 2238-2244.
21. Caballero JL, Martinez E, Malpartida F, Hopwood DA (1991) Organisation and functions of the actVA region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 401-412.
22. Carpusca I, Jank T, Aktories K (2006) *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin (MTX) and pierisin: the enigmatic offspring from the family of ADP-ribosyltransferases. *Mol. Microbiol.* **62**: 621-630.
23. Carrol SF és Collier RJ (1984) NAD binding site of diphteria toxin: identification of a residue within the nicotinamide subsite by photochemical modification with NAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3307-3311.
24. Chandra G és Chater KF (2008) Evolutionary flux of potentially bldA-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA. *Antonie Leeuwenhoek* **94**: 111-126.
25. Champness W (2000) Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. In *Prokaryotic Development*, pp. 11-31. Edited by Brun YV and Shimkets LJ. American Society for Microbiology, Washington DC, USA
26. Chater KF (1984) Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In *Microbial development*, pp. 89-115. Edited by Losick L and Shapiro L. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA
27. Chater KF (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 685-713.
28. Chater KF és 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 JH and Dworkin M. Oxford University Press, New York, NY
29. Chater KF (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**: 1465-1478.
30. Chater KF (2000) Developmental decisions during sporulation in the aeryal mycelium in *Streptomyces*. In *Prokaryotic development*, pp. 33-48. Edited by Brun YV and Shimkets LJ. American Society for Microbiology, Washington DC
31. Chater KF (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 667-673.

32. Chater KF (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* **361**: 761-768.
33. Chater KF és Chandra G (2008) The use of the rare UUA codon to define "expression space" for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J. Microbiol.* **46**: 1-11.
34. Cho Y-H, Lee E-J, Ahn B-E, Roe J-H (2001) SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **42**: 205–214.
35. Claessen D, Stokroos I, Deelstra HJ, Penningra NA, Bormann C, Salas JA, Dijkhuizen L, Wöüsten HAB. (2004) The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol.* **53**: 433-443.
36. Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HAB (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *TRENDS in Microbiology.* **14**: 313-319.
37. Collier RJ (1967) Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J. Mol. Biol.* **25**: 83-98.
38. Corda D és Di Girolamo M (2002) Mono-ADP-ribosylation: a tool for modulating immune response and cell signaling. *Sci. STKE* PE53.
39. Corda D és Di Girolamo M (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* **22**: 1953-1958.
40. Dabbs ER, Yazawa K, Mikami Y, Miyaji M, Morisaki N, Iwasaki S, Furihata K (2005) Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1007-1009.
41. de Souza RF és Aravind L (2012) Identification of novel components of NAD-utilizing metabolic pathways and prediction of their biochemical functions. *Mol. Bio Syst.* **8**: 1661-1677.
42. Demain AL (1988) Contribution of genetics to the production and discovery of microbial pharmaceuticals. *Pure and Applied Chemistry.* **60**: 833-836.
43. Deng Q és Barbieri JT (2008) Molecular mechanism of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**: 271-288.
44. de Souza RF és Aravind L (2012) Identification of novel components of NAD-utilizing metabolic pathways and prediction of their biochemical functions. *Mol. Bio. Syst.* **8**: 1661-1677.
45. Develoux M, Dieng MT, Kane A, Ndiaye B (2003) Management of mycetoma in West-Africa. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **96**: 376-382.
46. Deveze-Alvarez M, García-Soto J, Martínez-Cadena G (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is negatively regulated by ADP-ribosylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Microbiology.* **147**: 2579-2584.
47. Di Girolamo M, Dani N, Stilla A, Corda D. (2005) Physiological relevance of the endogenous mono(ADP-ribosyl)ation of cellular proteins. *FEBS J.* **272**: 4565-4575.
48. Di Paola S, Micaroni M, Di Tullio G, Buccione R, Di Girolamo M (2012) PARP16/ARTD15 is a novel endoplasmic-reticulum-associated mono-ADP-ribosyltransferase that interacts with, and modifies karyopherin- β 1. *PLoS One* **7**: e37352
49. Domenighini M, Montecucco C, Ripke WC és Rappuoli R (1991) Computer modelling of the NAD binding site of ADP-ribosylating toxins: active-site structure and mechanism of NAD binding. *Mol. Microbiol.* **5**: 23-31.
50. Domenighini M és Rappuoli R (1996) Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **21**: 667-674.

51. Driessen AJ, Rosen BP, Konings WN (2000) Diversity of transport mechanism: common structural principles. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 397-401.
52. Eastman D és Dworkin M (1994) Endogenous ADP-ribosylation during development of the prokaryote *Myxococcus xanthus*. *Microbiology-UK*. **140**: 3167-3176.
53. Edmonds C, Griffin GE, Johnstone AP (1989) Demonstration and partial characterization of ADP-ribosylation in *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem. J.* **261**: 113-118.
54. Ellis MW, Griffith ME, Jorgensen JH, Hospenthal DR, Mende K, Patterson JE (2009) Presence and molecular epidemiology of virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing and infecting soldiers. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 940-945.
55. Faraone-Mennella MR, De Maino A, Petrella A, Romano M, Favalaro P, Gambacorta A, Lama L, Nicolaus B, Farina B (2006) The (ADP-ribosyl)ation reaction in thermophilic bacteria. *Res. Microbiol.* **157**: 531-537.
56. Fernández-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, Malpartida F (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*. **66**: 769-780.
57. Fernández-Moreno MA, Martínez E, Caballero JL, Ichinose K, Hopwood DA, Malpartida F (1994) DNA sequence and functions of the actVI region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* **269**: 24854-24863.
58. Fieldhouse RJ és Merrill AR (2008) Needle in the haystack: structure-based toxin discovery. *Trends Biochem. Sci.* **33**: 546-556.
59. Flärdh K és Buttner MJ (2009) *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 36-49.
60. Floriano B és Bibb M (1996) *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **21**: 385-396.
61. Fu H, Hartmann A, Lowery RG, Fitzmaurice WP, Roberts GP, Burris RH (1989) Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* **171**: 4679-4685.
62. Geipel U, Just I, Aktories K (1996) ADP-ribosylation of an similar to 70-kilodalton protein of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 1720-1723.
63. Gianniosis M, Berardi V, Bonincontro A, Dabbs E, Risuleo G (2008) Charge redistribution in adenosylribosyl transferase caused by substitution of a single amino acid residue. *Z. Naturforsch C.* **63**: 889-92.
64. Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Köhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiler E, Haag F, Koch-Nolte F (2002) The family of toxin related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and mouse. *Protein Sci.* **11**: 1657-1670.
65. Goodfellow M és Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
66. Goshi K, Uchida T, Lezhava A, Yamasaki M, Hiratsu K, Shinkawa H, Kinashi H (2002) Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* : 3411-3415.
67. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 1541-1546.

68. Haar vd B, Walter S, Schwapenheuer S, Schrempf H (1997) A novel fusidic acid resistance gene from *Streptomyces lividans* 66 encodes a highly specific esterase. *Microbiol.* **143**: 867-874.
69. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou és mtsai (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126**: 941-955.
70. Halbleib CM és Ludden PW (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutrition.* **130**: 1081-1084.
71. Han S, Craig JA, Putnam CD, Carozzi NB, Tainer JA (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat. Struct. Biol.* **6**(10): 932-6.
72. Han S és Tainer JA (2002) The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 523-529.
73. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: Where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* **70**: 789-829.
74. Hassa PO és Hottinger MO (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci.* **13**: 3046-3082.
75. Haug I, Weissenborn A, Brolle D, Bentley S, Kieser T, Altenbuchner J (2003) *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*: Deductions from the complete sequence. *Microbiology.* **149**: 505-513.
76. Hayaishi O és Ueda K (1985) ADP-ribosylation. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 73-100.
77. Hengel SM, Shaffer SA, Nunn BL, Goodlett DR (2009) Tandem mass spectrometry investigation of ADP-ribosylated kemptide. *J. Am. Soc. Mass Spetrom.* **20**: 477-483.
78. Herrero-Yraola A, Bakhit SM, Franke P, Weise C, Schweiger M, Jorcke D, Ziegler M. (2001) Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J* **20**: 2404-2412.
79. Hesketh AR, Fink D, Gust B, Rexer H-U, Scheel B, Chater KF, Wohlleben W, Engels A (2002) The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **46**: 319-330.
80. Hettiarachi KD, Zimmet PZ, Myers MA (2008) Dietary toxins, endoplasmatic reticulum (ER) stress and diabetes. *Curr. Diabetes. Rev.* **4**: 146-56.
81. Holbourn KP, ShoneCC, Acharya KR (2006) A family of killer toxins - Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS Journal.* **273**: 4579-4593.
82. Hopwood DA (2007) *Streptomyces* in nature and medicine. Oxford University Press, New York, NY.
83. Horinouchi S és Beppu T (1999) Autoregulatory factors and communication in Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 377-398.
84. Hottinger MO, Hassa PO, Lusher B, Schuler H, Koch-Nolte F (2010) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 208-219.
85. Hsiao N-h és Kirby R (2007) Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system. *Antonie Leeuwenhoek*, **93**: 1-25.

86. Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Butner MJ, Cohen SN (2005) Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **58**: 1276-87.
87. Huh JW, Shima J, Ochi K (1996) ADP-ribosylation of proteins in *Bacillus subtilis* and its possible importance in sporulation. *J. Bacteriol.* **178**: 4935-4941.
88. Huisman GW és Kolter R (1994) Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science*. **265**: 7-539.
89. Hutchings MI, Hong H-J, Buttner MJ (2006) The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **59**: 923-935.
90. Hutchings MI, Palmer T, Harrington DJ, Sutcliffe IC, Buttner M (2009) Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends Microbiol.* **17**: 13-21.
91. Inaoka T és Ochi K (2002) RelA protein is involved in induction of genetic competence in certain *Bacillus subtilis* strains by moderating the level of intracellular GTP. *J. Bacteriol.* **184**: 3923-3930.
92. Isiegas C, Parro V, Mellado RP (1999) *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM beta-lactamase. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 321-326.
93. Jobst K, Lakatos A, Horváth A (1992) Identification of basic nuclear proteins by their boronate complex. *Biotech. Histochem.* **67**: 158-160.
94. Jørgensen R, Purdy AE, Fieldhouse RJ, Kimber MS, Bartlett DH, Merrill AR (2008) Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* **283**: 10671-10678.
95. Kato-Murayama M, Bessho Y, Shirouzu M, Yokoyama S (2005) Crystal structure of the RNA2'-phosphotransferase from *Aeropyrum pernix* K1. *J. Mol. Biol.* **348**: 295-305.
96. Kämpfer P (2006) The family *Streptomycetaceae*. Part I: Taxonomy. In *The prokaryotes*. pp: 538-604. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H and Stackebrandt E, Springer, New York, USA
97. Kieser TM, Bibb J, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) Practical *Streptomyces* genetics, The John Innes Foundation, Norwich, UK.
98. Kleine H, Herrmann A, Lamark T, Forst AH, Verheugd P, Lüscher-Fizlaff J, Lippok B, Feijs KHL, Herzog N, Kremmer E, Johansen T, Müller-Newn G, Lüscher B (2012) Dynamyc subcellular localization of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10 and interaction with the ubiquitin receptor p62. *Cell. Commun. Signal.* **10**: 28.
99. Koch-Nolte F, Haag F, Kastelein R, Bazan F (1996) Uncovered: the family relationship of a T-cell-membrane protein and bacterial toxins. *Immunology today* **17**: 402-405.
100. Koch-Nolte F és Haag F (1997) Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**: 1-13.
101. Laing S, Unger M, Koch-Nolte F (2011) ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids* **41**: 257-269.
102. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W és mtsaik (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
103. Letseka HS (2010) Biochemical characterization of the *Mycobacterium smegmatis* rifampicin ADP-ribosylating enzyme ARR. (MSc thesis) pp: 31. University of the Witwatersrand, Johannesburg

104. Leung AK, Vyas S, Rood JE, Bhutkar A, Sharp PA, Chang P (2011) Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol. Cell* **42**: 489-499.
105. Lewandowska-Skarbek VM, Wang YG, Donadio S és 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.
106. Li H, Jacques PE, Ghinet MG, Brzezinski R, Morosoli R (2005) Determining the functionality of putative Tat-dependent signal peptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using two different reporter proteins. *Microbiology-UK*. **151**: 2189-2198.
107. Liu Y és Kahn ML (1995) ADP-ribosylation of *Rhizobium meliloti* glutamine synthetase III in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**: 1624-1628.
108. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) Molecular Cell Biology, Section 5.1, 4th edition. New York: W. H. Freeman
109. Lowery RG és Ludden PW (1990) Endogenous ADP-ribosylation in prokaryotes. In *ADP-ribosylating toxins and G-proteins*, pp. 459-468. Edited by Moss J and Vaughan M. American Society for Microbiology, Washington DC, USA
110. Ludden PW (1994) Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* **138**: 123-129.
111. Masignani V, Balducci E, Serruto D, Veggi D, Aricó B, Commanducci M, Pizza M, Rappuoli R (2004) *In silico* identification of novel bacterial ADP-ribosyltransferases. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 471-478.
112. Matsushima-Hibiya Y, Watanabe M, Kono T, Kanazawa T, Koyama K, Sugimura T, Wakabayashi K. (2000) Purification and cloning of pierisin-2, an apoptosis-inducing protein from cabbage-butterfly, *Pieris brassicae*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5742-5750.
113. Messner P (1997) Bacterial glycoproteins. *Glycoconjugate J.* **14**: 3-11.
114. Miguelez EM, Hardisson C, Manzanal MB (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell. Biol.* **145**: 515-525.
115. Molle V, Palframan WJ, Findlay KC, Buttner MJ (2000) WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **182**: 1286–1295.
116. Moss J, Zolkiewska A, Okazaki I (1997) ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partner in ADP-ribosylation cycles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**: 25-33.
117. Mueller UG és Gerardo N (2002) Fungus farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS*. **99**: 15247-15249.
118. Mukherjee R és Chatterji D (2005) Evaluation of the role of sigma B in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **338**: 964-972.
119. Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y. (2013) ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon* **63**: 55-63.
120. Nagahama M, Sakaguchi Y, Kobayashi K, Ochi S, Sakurai J (2000) Characterization of the enzymatic component of *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J. Bacteriol.* **182**: 2096-2103.
121. Natale P, Brüser T, Driessen AJM (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane – Distinct translocases and mechanism. *Biochim. Biophys Acta* **1778**: 1735-1756.

122. Nielsen JB és Lampen JO (1982) Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **152**: 315-322.
123. Nodwell JR, 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**: 881-93.
124. Nodwell JR (2007) Novel links between antibiotic resistance and antibiotic production. *J. Bacteriol.* **189**: 3683-3685.
125. Ochi K, Penyige A, Barabás Gy (1992) The possible role of ADP-ribosylation in sporulation and streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1745-1750.
126. Okano H, Hwa T, Lenz P, Yan D (2010) Reversible adenylation of glutamine synthetase is dynamically counterbalanced during steady-state growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **404**: 522-36.
127. Okazaki IJ, Zolkiewska A, Takada T, Moss J (1995) Characterization of mammalian ADP-ribosylation cycles. *Biochimie* **77**: 319-325.
128. Okazaki IJ és Moss J (1996) Mono-ADP-ribosylation: a reversible posttranslational modification of proteins. *Adv. Pharmacol.* **35**: 247-280.
129. Okazaki IJ, Kim HJ, Moss J (1996) Cloning and characterization of a novel membrane-associated lymphocyte NAD: arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**: 22052-22057.
130. Okazaki IJ és Moss J (1998) Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **273**: 23617–23620.
131. Okazaki IJ és Moss J (1999) Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 485-509.
132. Oppenheimer NJ és Handlon AL (1992) Mechanism of NAD-dependent enzymes In *The enzymes* pp. 453-505. Edited by Sigman DS. Vol. XX. Academic Press, San Diego, USA
133. Otto H, Tezcan-Merdol D, Girish R, Haag F, Rhen M és mtsai (2000) The SpvB gene-product of the salmonella enterica virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Mol. Microbiol.* **37**: 1106-1115.
134. Pallen MJ, Lam AC, Loman NJ, McBride A (2001) An abundance of bacterial ADP-ribosyltransferases – implications for the origin of exotoxins and their human homologues. *Trend Microbiol.* **9**: 302-307.
135. Palmer T és Hutchings MI (2011) Protein secretion in *Streptomyces* In *Streptomyces molecular biology and biotechnology* pp. 87-90. Edited by Dyson P. Craisted Academic Press, Norfolk, UK.
136. Penyige A, Barabás G, Szabó I, Ensign JC (1990) ADP-ribosylation of membrane proteins of *Streptomyces griseus* strain 52-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 293-297.
137. Penyige A, Kálmánchelyi A, Sipos A, Ensign JC, Barabás G (1994) Modification of glutamine synthetase in *Streptomyces griseus* by ADP-ribosylation and adenylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 598-605.
138. Penyige A, Deák E, Kálmánchelyi A, Barabás G (1996) Evidence of a role for NAD⁽⁺⁾-glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase in growth and differentiation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682: inhibition by m-aminophenylboronic acid. *Microbiol.* **142**: 1937-1944.
139. Piette A, Derouaux A, Gerkens P, Noens EEE, Mazzuchelli G, Vion S., Koerten HK, Titgemeyer F, De Pauw E, Leprince P, van Wezel GP, Galleni M, Rigali S (2005) From

- dormant to germinating spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2): New perspectives from the crp null mutant. *J. Proteome. Res.* **4**: 1699-1708.
140. Pradella S, Hans A, Spröer C, Reichenbach H, Gerth K, Beyer S (2002.) Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56". *Arch. Microbiol.* **178**(6): 484–92.
 141. Prosser JI, Gray DI, Gooday GW (1988) Cellular mechanism for growth and branch formation in *Streptomyces*. In *Biology of Actinomycetes '88*, pp. 316-323. Edited by Okami Y, Beppu T, Ogawara H. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan
 142. Quan S, Imai T, Mikami Y, Yazawa K, Dabbs R, Morisaki N, Iwasaki S, Hashimoto Y, Furihata K (1999) ADP-ribosylation as an intermediate step in inactivation of rifampin by a mycobacterial gene. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**: 181–184.
 143. Rahman O, Cummings SP, Harrington DJ, Sutcliffe IC (2008) Methods for the bioinformatic identification of bacterial lipoproteins encoded in the genomes of Gram-positive bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 2377-2382.
 144. Rappuoli R és Montecucco C (1997) Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. Oxford University press, Oxford, UK.
 145. Reinert DJ, Carpusca I, Aktories K, Schulz GE (2006) Structure of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus*. *J. Mol. Biol.* **357**: 1226-1236.
 146. Rieul C, Corta J-C, Bleicher F, Cozzone AJ (1987) Effect of bacteriophage M13 infection on phosphorylation of dnaK protein and other *Escherichia coli* proteins. *Eur. J. Biochem.* **168**: 621-627.
 147. Ritter H, Koch-Nolte F, Marquez VE, Schulz GE (2003) Substrate binding and catalysis of ecto-ADPp-ribosyltransferase 2.2 from rat. *Biochemistry.* **42**: 10155-10162.
 148. Ruban-Osmialowska B, Jakimowicz D, Smulczyk-Krawczyszyn A, Chater KF, Zakrzewska-Czerwińska J (2006) Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **188**: 7311-7316.
 149. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
 150. Schirmer J, Just I, Aktories K (2002) The ADP-ribosylating mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus*. *J. Biol. Chem.* **277**: 11941–11948.
 151. Schneider D és Chater KF (1996) Characterization of spa a *Streptomyces coelicolor* gene homologous to a gene involved in sensing starvation in *Escherichia coli*. *Gene* **177**: 243-251.
 152. Seman M, Adriouch S, Haag H, Koch-Nolte F (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr. Med. Chem.* **11**: 857-872.
 153. Serres MH és Ensign JC (1996) Endogenous ADP-ribosylation of proteins in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **178**: 6074-6077.
 154. Shima J, Penyige A, Ochi K (1996) Changes in patterns of ADP-ribosylated proteins during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its developmental mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 3785-3790.
 155. Shrey SD és Tarkka MT (2008) Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Leeuwenhoek* **94**: 11-9.
 156. Silmann NJ, Carr NG, Mann NH (1995) ADP-ribosylation of glutamine synthetase in the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **177**: 3527-3533.
 157. Stallings CL, Chu L, Li LX, Glickman MS (2011) Catalytic and non-catalytic roles for the mono-ADP-ribosyltransferase Arr in the *Mycobacterial* DNA damage response. *PLoS One* **6**: e21807.

158. Stanley AE, Walton LJ, Zerikly MK, Corre C, Challis GL (2006) Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy- 2,29-bipyrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis. *Chem. Comm. Art.* **38**: 3981-3983.
159. Stephenson K (2005) Sec-dependent protein translocation across biological membranes: Evolutionary conservation of an essential protein transport pathway. *Mol. Membr. Biol.* **22**: 17-28.
160. Strohl WR (1997) Industrial antibiotics: today and the future. In *Biotechnology of Antibiotics*. 2nd edn. pp. 1-47. Edited by Strohl WR, Marcell Dekker, New York, USA
161. Sugawara K, Dohmae N, Kasai K, Saido-Sakanaka H, Okamoto S, Takio K, Ochi K (2002) Isolation and identification of novel ADP-ribosylated proteins from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2292-2296.
162. Taguchi T, Okamoto S, Lezhava A, Li A, Ochi K, Ebizuka Y, Ichinose K (2007) Possible involvement of ActVI-ORFA in transcriptional regulation of *actVI* tailoring-step genes for actinorhodin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**: 234-239.
163. Taguchi T, Ebihara T, Furukawa A, Hidaka Y, Ariga R, Okamoto S, Ichinose K (2012) Identification of the actinorhodin monomer and its related compound from a deletion mutant of the *actVA*-ORF4 gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**: 5041-5045.
164. Tahlan K, Ahn SK, Sing A, Bodnaruk TD, Willems AR, Davidson AR, Nodwell JR (2007) Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **63**: 951-961.
165. Takamura-Enya T, Watanabe M, Totsuka Y, Kanazawa T, Matsushima-Hibiya Y, Koyama K, Sugimura T, Wakabayashi K (2001) Mono(ADP-ribosyl)ation of 2*-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 12414–12419.
166. Thompson CJ, Fink D, Nguyen LD (2002) Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol.* **3**: reviews1020.1-1020.4
167. Treiber N, Reinert DJ, Carpusca I, Aktories K, Schulz GE (2008) Structure and mode of action of a mosquitocidal holotoxin. *J. Mol. Biol.* **381**: 150-159.
168. vanWezel GP, White J, Bibb MJ, Postma PW (1997) The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 604-608.
169. 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.
170. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 495–548.
171. Vincent TJ, Fraylick JE, McGuffie EM, Olson JC (1999) ADP-ribosylation of oncogenic Ras proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S *in vivo*. *Molecular Microbiology* **32**: 1054-1064.
172. Vogelsang M és Aktories K (2006) Exchange of glutamine-217 to glutamate of *Clostridium limosum* exoenzyme C3 turns the asparagine-specific ADP-ribosyltransferase into an arginine-modifying enzyme. *Biochemistry* **45**: 1017-1025
173. Watanabe M, Enomoto S, Takamura-Enya T, Nakano T, Koyama K, Sugimura T, Wakabayashi K (2004) Enzymatic properties of pierisin-1 and its N-terminal domain, a

- guanine-specific ADP-ribosyltransferase from the cabbage butterfly. *J. Biochem.* **135**: 471-477.
174. Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschroder M, Palmer T (2006) The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 17927-17932.
 175. 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 Dev.* **75**: 895-903.
 176. Willey JM, Willems A, Kodani S, Nodwell JR (2006) Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **59**: 731-742.
 177. Wilson BA és Collier RJ (1992) Diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: active-site structure and enzymic mechanism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **175**: 27-41.
 178. Woehle DL, Lueddecke BA, Ludden PW (1990) ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **23**: 13741-13749.
 179. Wolpert M, Gust B, Kammerer B, Heide L (2007) Effects of deletions of *mbtH*-like genes on chlorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* **153**:1413-1423.
 180. Wu HC (1996) Biosynthesis of lipoproteins. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. Second edition, Vol.1. pp: 1005-1014. Edited by Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. ASM Press, Washington DC, USA
 181. Ueda K és Hayaishi O. (1985) ADP-ribosylation. *Annu. Rev.Biochem.* **54**: 73-100.
 182. Yakunin AF és Hallenbeck PC (2002) AmtB is necessary for NH₄⁺-induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **184**: 4081–4088.
 183. Yelamos J, Farres J, Llacuna L, Ampurdanes C és Martin-Cabarello J (2011) PARP-1 and PARP-2: New players in tumor development. *Am. J. Cancer Res.* **1**(3): 328-346.
 184. Zhang RG, Scott DL, Westbrook ML, Nance S, Spangler BD, Shipley GG, Westbrook EM (1995) The 3-dimensional crystal-structure of cholera-toxin. *J. Mol. Biol.* **251**: 563-573.
 185. Zomber G, Reuveny S, Garti N, Shafferman A, Elhanany E (2005) Effects of spontaneous deamidation on the cytotoxic activity of the *Bacillus anthracis* protective antigen. *J. Biol. Chem.* **280**: 39897-39906.

12. TÁRGYSZAVAK

Streptomyces coelicolor

mono-ADP-riboziláció

mono-ADP-riboziltranszferáz

ADP-ribozilált fehérjék

2-D gélelektroforézis

MALDI TOF tömegspektrometriás analízis

SCO5461 gén

ReDirect

morfológiai differenciálódás

actinorhodin

13. KEYWORDS

Streptomyces coelicolor

mono-ADP-ribosylation

mono-ADP-ribosyltransferase

protein ADP-ribosylation

2-D SDS PAGE

MALDI TOF

SCO5461 gene

ReDirect

morphological differentiation

actinorhodin

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az alábbi pár sorban szeretném a hálámat szavakba önteni azoknak, akik a segítségükkel hozzájárultak ahhoz, hogy végre pont kerülhessen egy igen régen elkezdett történet utolsó mondatának végére. Itt kérnék elnézést azoktól, akik úgy érzik, hogy nem a megfelelő formában fejeztem ki hozzájárulásukat.

Mindenekelőtt szeretnék szívem mélyéből köszönetet mondani Dr. Penyige Andrásnak, aki hozzáértő szakmai segítségével mind gyakorlati, mind elméleti tudásomat bővítette, és aki új reményt adott akkor, amikor már reményvesztetté kezdtem volna válni. Köszönöm korábbi témavezetőmnek, Dr. Fehér Zsigmondnak, hogy különböző kutatási témákban dolgozva gyarapíthattam módszertani ismereteimet. Köszönöm tanszékvezetőnknek, Prof. Dr. Biró Sándornak, hogy támogatott a munkámban.

Hálás vagyok az egykori Biológiai Intézet, most Humángenetikai Tanszék régi és mostani munkatársainak, hogy bármikor nyugodtan fordulhattam hozzájuk ügyes-bajos dolgaimmel, mindig szívesen segítettek nekem. Külön szeretném megköszönni Dr. Keserű Juditnak azt a sok, önzetlen segítségnyújtást, amivel megkönnyítette az életem. Köszönöm Komárominé Plébán Klárának korábbi munkáim során, Ottenberger Anikó „Zsuzsának” és Kompár Csillának pedig az utóbbi években folytatott kísérletekben való lelkiismeretes és tevékeny részvételét, továbbá Hádáné Dr. Birkó Zsuzsának a szakmai és gyakorlati tanácsait.

Megköszönöm Dr. Fazakas Ferencnek (DE OEC Patológiai Intézet) a MALDI-TOF tömegspektrometriás analízisben végzett munkáját, Dr. Vámosi Györgynek (DE OEC Biofizikai Intézet) és Kovács Krisztinának pedig, hogy segítettek a konfokális mikroszkópos vizsgálatokban. Köszönöm Dr. Pecsénye Katalinnak a DE TTK Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszékén a sztereomikroszkópos fotózáshoz, Dr. Márián Teréznek (DE OEC Nukleáris Medicina) a radiogrammok elkészítéséhez nyújtott segítségét.

Külön köszönöm Gálné Dr. Miklós Idának (DE TTK, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék) a fáziskontraszt mikroszkópos fotózáshoz és az elektroporátor használatához nyújtott segítségén túl az évek óta szünni nem tudó jóindulatát és türelmét.

Köszönettel tartozom Székely Lászlónak (Karolinska Institutet, Stockholm) és John Doonan-nak (John Innes Centre, Norwich), hogy laboratóriumukban dolgozva elmélyíthettem elméleti és gyakorlati molekuláris biológiai tudásom és az angol nyelvben is nagyobb jártasságot szerezhettem.

Utolsóként került rájuk a sor, de így emelem ki őket: Édesanyámat, aki szeretetével és lelkesítő támogatásával végigkísérte az életem minden eddigi napját, édesapámat, néhai Nagymamámat és Nagypapámat, az egész Szentesi családot, legjobb barátnőmet, Esztert és végül, de egyáltalán nem utolsósorban a férjemet, Tomit és két kicsi gyermekemet, Bogit és Gergőt. Mindnyájuk miatt érzem magam otthon a világban, Ők tettek szeretetükkel és türelmükkel boldoggá, támogattak és óvtak engem, hogy a nehéz időkben is megőrizhessem lelki derűmet.

15. FÜGGELÉK

15.1. 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

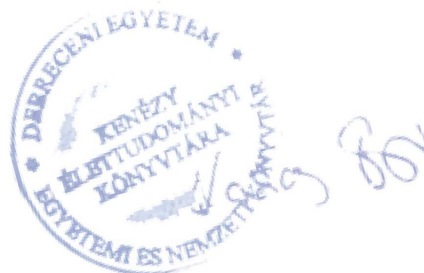
Jelölt: Szirák Krisztina

Neptun kód: LN1JSL

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szirák, K.**, Keserű, J., Biró, S., Schmelcz, 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., Schmelcz, 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



15.2. 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.11.20



15.3. Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

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

15.4. 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 Ca^{++} felszabadulást vált ki élesztő-sejtben. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, Pécs. (poszter)

15.5. Tudománymetriai adatok

Összesített impakt faktor: 8,285

Összes idézet: 22

h-index: 2

i10 index: 1