

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

Doktori (PhD) értekezés

Ferenczi Szilamér Imre

Gödöllő 2008 A doktori iskola

megnevezése:	Biológia Tudományi Doktori Iskola		
tudományága:	Biológia Tudományok		
vezetője:	Dr. Tuba Zoltán tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar Növénytani és Növényélettani Tanszék		
témavezetők:	Dr. Orosz László tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA levelező tagja ELTE Természettudományi Kar		
	Dr. Papp Péter tudományos főmunkatárs, Ph.D. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont		
	Iskolavezető jóváhagyása:		
	Dr. Tuba Zoltán		
	Témavezetők jóváhagyása:		
	••••••		
$\mathbf{D} = \mathbf{O} = \mathbf{T}'$	\mathbf{L}' $\mathbf{D} = \mathbf{D} \mathbf{D} \mathbf{T} \mathbf{D}$		

Dr. Orosz László

Dr. Papp Péter

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1. Bakteriofág szabályozó elemek	1
1.2. Addikciós modulok	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A 16-3 bakteriofág általános jellemzése	3
2.2. Helix –turn-helix (HTH) típusú DNS kötő fehérjék	5
2.3. A 16-3 fág szabályozó régiója	7
2.4. Addikciós modulok	12
2.5. Plazmidok stabilizációja addikciós modulok segítségével	14
2.6.1. Az F plazmid <i>ccd</i> lókusza	16
2.6.2. A <i>relBE</i> gének	17
2.6.3. Az Rts1 plazmid higBA rendszere	17
2.6.4. Az RK2 plazmid <i>parDE</i> génjei	18
2.6.5. A <i>pem</i> és <i>mazEF</i> (<i>chp</i>) lókuszok	18
2.6.6. A <i>phd/doc</i> TA rendszer	19
2.6.7. <i>vapBC</i> lókuszok	19
2.6.8. Az ω - ε - ζ lókusz	20
2.7. Két speciális csoport	20
2.7.1. A II. típusú restrikciós- modifikációs (RM) rendszerek	20
2.7.2. A <i>hipBA</i> lókusz	20
2.8. Szerkezet és reguláció az addikciós modulok körében	21
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1. Felhasznált baktériumtörzsek és bakteriofágok	25
3.2. Felhasznált plazmidok	25
3.3. Oligonukleotidok	26
3.4. Baktériumok tenyésztéséhez használt táptalajok	27
3.5. A plazmidba épített fragment fágba juttatása homológ rekombinációval	28
3.6. Plazmid DNS bejuttatása baktériumsejtekbe	28
3.6.1 Bakteriális sejtek transzformálása	28
3.6.2. Konjugáció (három szülős)	28
3.7. Plazmid DNS tisztítása	29
3.8. Totál-DNS preparátum készítése	29
3.9. Totál-RNS preparátum készítése	29

3.10. DNS minták emésztése restrikciós endonukleázokkal	29
3.11. DNS fragmentumok elválasztása	30
3.12. DNS fragmentumok izolálása agaróz gélből	30
3.13. Szintetikus oligonukleotidok plazmidba építése	30
3.14. DNS fragmentumok ligálása	30
3.15. DNS nukleotidsorrend meghatározása	30
3.16. Transzkripciós starthely meghatározása (primer extension)	31
3.17. Polimeráz láncreakció (PCR)	31
3.18. β–Galaktozidáz aktivitásmérés	31
3.19. Fehérje túltermeltetés	32
3.20. Fág DNS tisztítás	32
3.21. Fehérjék elválasztása	32
3.22. His-tag jelölt fehérjék izolálása, tisztítása	32
3.23. Gél-retardációs teszt ("band-shift")	33
3.24. DN-áz I footprint	33
3.25. Hidroxil gyök footprint	33
3.26. Bioinformatikai módszerek és internet oldalak	33
3.27. Vegyszerek és enzimek	33
4. EREDMÉNYEK	
4.1. Bevezetés	35
4.2. Egy kópiás <i>in vivo</i> mérőegység előállítása	35
4.2.1. pGSB1 vektor tesztelése a 16-3 fág C represszor	
fehérje és kötőhelyeinek in vivo vizsgálatára	37
4.2.2. A C represszor felismerő hélix aminosav oldalláncainak fontossága	
az operátorokkal kialakított kölcsönhatás során (alanin scanning)	39
4.2.3. Operátor mutánsok előállítása	41
4.2.4. Megváltozott specificitású represszor vizsgálata vad és mutáns O_{R2} operátorokon	43
4.2.5. Megváltozott specifitású mutáns represszor viselkedése O_{L2} típusú operátoron	45
4.3. A. tumefaciens addikciós modul jellemzése	46
4.3.1. <i>pemIK</i> homológ TA modul izolálása	46
4.3.2. Promóter régió és transzkripciós starthely azonosítása	47
4.3.3. Toxin - Antitoxin kapcsolódásának és operátorával történő	
interakciójának kimutatása	49
4.3.4. TA fehérjék komplex alkotásának vizsgálata	51

4.3.5. PemIK fehérjék interakció vizsgálata az operátor régióval, operátor azonosítása	53
4.3.6. A <i>pemIK</i> fiziológiás szerepe	57
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	59
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	61
6.1. Az A. tumefaciens pemIK toxin-antitoxin modul jellemzése	61
6.2. Transzkripciós starthely maghatározása	61
6.3. A <i>pemIK</i> operon autoregulációja	62
6.4. TA fehérjék komplex alkotásának vizsgálata	64
6.5. pemIK operátor azonosítása in vivo és in vitro módszerekkel	64
6.6. A PemIK rendszer fiziológiás szerepe	66
6.7. A. tumefaciens pemIK operonjának lehetséges biotechnológiai hasznosítása	67
6.7.1. Plazmid stabilizáció	67
6.7.2. Pozitív szelekciós vektor	67
6.7.3. Önmegsemmisítő baktériumok	68
6.7.4. A <i>pemIK</i> TA komplex potenciális antibiotikum target	68
6.8. 16-3 bakteriofág egy kópiás mérőegységének előállítása	68
6.9. Alanin scanning	69
6.10. Operátor mutánsok vizsgálata	69
6.11. Megváltozott specificitású represszor vizsgálata vad és mutáns O_{R2} operátorokon	70
6.12. Megváltozott specifitású mutáns represszor viselkedése O_{L2} típusú operátoron	71
7. ÖSSZEFOGLALÁS	73
8. SUMMARY	75
9. MELLÉKLETEK	77
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	90

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
E.coli	Escherichia coli
R. meliloti	Rhizobium meliloti
λ	lambda
ATP	adenozin trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
bp	bázispár
kbp	kilobázispár
kDa	kilodalton
nt	nukleotid
CFU	colony forming unit
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
Amp	ampicillin
Km	kanamicin
Sp	spektinomicin
Str	streptomicin
SD	standard deviation, szórás
MU	Miller Unit
EMSA	electromobility shift assay
ТА	toxin-antitoxin
Wt	wild type, vad típus

1. BEVEZETÉS

1.1. Bakteriofág szabályozó elemek

A baktériumokat fertőző vírusok (bakteriofágok) a molekuláris biológiai és genetikai kutatások fontos modell rendszereként szolgálnak. A bakteriofágok tanulmányozásán keresztül nyílt lehetőség számos alapvető biológiai folyamat megértésére. Többek között a génszabályozásra, rekombinációra, DNS replikációra, transzkripcióra vonatkozó ismeretanyagunk nagyrészt a bakteriofág genetikának köszönhető. Napjainkban a fágok nem pusztán a molekuláris biológiai folyamatok megértésének alanyai, hanem többek között a modern biotechnológia eszköztára is jelentősen bővült a fágokból izolált "molekuláris eszközök" felhasználása révén.

Mindezeken túlmenően a bakteriofágok már önmagunkban is érdekesek, változatosak, mennyiségi szempontból is számottevőek, hiszen e kétszálú DNS vírusok a bioszféra legnagyobb csoportját képviselik, kb. 10⁸ fág fajt feltételeznek és becslések szerint több mint 10³¹ (Hendrix és mtsai., 2002) nagyságú a kétszálú DNS vírus populáció a világon. Mivel a bakteriofágok kizárólagos paraziták, és egyes feltételezések szerint akár 50 másik, ugyanazt a gazdabaktériumot fertőző fágfajjal kell versengeniük, így a fennmaradásukhoz az egyes vírusok rendkívül változatos szabályozó mechanizmusokat fejlesztettek ki az idők folyamán. A fágok életciklusát szabályozó fehérjéknek az operátoraikkal kialakított kapcsolatai különösen izgalmasak és tanulmányozásuk bepillantást enged a génszabályozás legmélyebb titkaiba.

1.2. Addikciós modulok

A baktériumok a stresszhatások leküzdésére számos fegyvert fejlesztettek ki evolúciójuk során. Ezek közül napjaink tudománya által nagy érdeklődéssel kísért hadszínterek a toxin-antitoxin felismerő rendszereken alapuló mechanizmusok (addikciós modulok).

Szerepük bizonyított a programozott sejthalál, plazmid stabilitási, transz-transzlációs "minőségbiztosítási" rendszerekben de az anyagcsere folyamatok és a perzisztens sejt képződésén át egyre több biológiai folyamatban is. A bakteriofágok irodalmának tanulmányozása során találtunk rá a *P1* fág stabilitási faktoraként használt addikciós rendszerre, mely végső soron felkeltette az érdeklődésünket a TA rendszerek iránt. Számos típusuk a patogén baktériumok elleni folyamatos harcban potenciális antibiotikum targetként tekinthető, ezért nagyon fontos a tanulmányozásuk, megismerésük mindenki számára.

A dolgozat egy fág represszor és egy bakteriális addikciós modul molekuláris elemzését írja le. Kiemelt szerepet kap a témák tárgyalása során a DNS-fehérje kapcsolatok kialakulásának szerepe a génszabályozás során. Kísérleteinket olyan részletességgel terveztük, hogy eljussunk a modellalkotás szintjére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A 16-3 bakteriofág általános jellemzése

A *16-3* lizogén bakteriofágot Balatonberény környékéről származó talajmintából izolálták az 1960as évek elején (Ördögh és Szende, 1961). A *16-3* gazdabaktériuma a Gram negatív, szimbiotikus nitrogénkötő *Rhizobium meliloti* 41 (Szende és Ördögh, 1960)- legújabb nevezéktan szerint *Sinorhizobium meliloti*- melynek három szimbiotikus partnere közül gazdaságilag legfontosabb a lucerna (*Medicago sativa*). A fág életciklusa a fertőzéstől a gazdasejt líziséig 28°C-on 100, 36°C-on 80 perc. Az érett fágrészecske elkészüléséhez 28°C-on 80, 36°C-on 65 percre van szükség (Orosz és Sík, 1970; Orosz és mtsai., 1973).

A *16-3* fág kromoszómája kétszálú, lineáris, 60 kbp nagyságú DNS molekula (Dallmann és mtsai., 1979), amely 10 nukleotid hosszúságú 3' túlnyúló, ragadós végekkel ("cos" régió) rendelkezik (Ganyu és mtsai., 2005). A *16-3* fág genomjának nukleotidsorrend meghatározása befejeződött (Papp P.P. személyes közlése).

A *16-3* fág alapvető genetikai analízisét és genetikai térképezését mintegy 150 hőérzékeny (ts) mutáns 42 komplementációs csoportba sorolásával készítették el (Orosz és Sík, 1970; Sík és Orosz, 1971; Orosz és mtsai., 1980). A genetikai térkép lineáris és 40 térképegység hosszúságú. A térképezett géneket megnyilvánulásuk szerint korai és kései csoportba osztották (Orosz és mtsai., 1973). A kései gének csak akkor nyilvánulnak meg, ha a korai gének megfelelően működnek (Orosz. és mtsai., 1973; Kondorosi és mtsai., 1974). Noha a genetikai térkép lineáris, végpontjai mégsem egyeznek meg a fizikai térkép végpontjaival ("cos" régió). Ez részben azzal volt magyarázható, hogy az *att* és az ún. *immX* régió között egy rendkívül aktív rekombinációs "forró pont" van, melynek két oldalán elhelyezkedő gének kapcsoltsága megszűnt (Csiszovszki és mtsai., 2003).

A 16-3 egyik legjobban tanulmányozott génje a c regulátorgén, amely a lizogén életciklus szabályozásában játszik alapvető szerepet. Hőérzékeny alléljei 28°C-on vad típusú (turbid), 36°C-on tiszta (clear) tarfoltú fenotípust mutatnak. A c gén finomtérképezését kétpontos és intracisztronikus hárompontos térképezéssel oldották meg, elsőként Magyarországon. A mutációk helyes sorrendjét egy deléciós térképpel erősítették meg (Orosz és mtsai., 1980). A c gén finomtérképezésével lehetőség nyílt a 16-3 fág homológ rekombinációs mechanizmusának feltárására (Orosz és mtsai., 1980; Dudás és Orosz, 1980), amely a genetikai térképezési szabályok és a valós crossing over között feszülő ellentmondás feloldásához adott magyarázatot. Később bebizonyosodott, hogy a 16-3 fág rekombinációs útvonala a vártnál sokkal általánosabb érvényű, hiszen pl. a kloroplasztiszok rekombinációs jelenségeit is megmagyarázza. Az említett

ellentmondás a következőkben rejlik: a térképezési függvényen (Haldane függvény) alapuló géntérképezési logika a "véletlenszerű törés-újraegyesülés" crossing over modellel számol, azaz azt feltételezi, hogy a crossing overek pontszerű, statisztikus és autonóm események. Ugyanakkor a génkonverzió és a crossing over, ill. rekombináció összefüggéséből tudjuk, hogy a valóságos crossing over nem pontszerű, hanem jelentős hosszúságban érinti a rekombinálódó DNS molekulákat, tehát kiterjedése van. A crossing over esemény valóságos hossza (akár az 5 kbp hosszúságot is elérheti) sokszorosa lehet egy átlagos génnek (c gén pl. 1 kbp hosszúságú). Ugyancsak a génkonverziós jelenségek elemzéséből tudjuk, hogy a fellépő crossing overek nem statisztikusan szóródnak a DNS mentén és nem is teljesen autonóm események. Ennek ellenére a gének finomtérképezésekor alkalmazható volt a törés-újraegyesülésre és az ideális crossing over-re építő Haldane függvény. A 16-3 rekombinációjának vizsgálatából levezetett ún. "hosszú Holliday kereszt vándorlás-heteroduplex és mismatch képződés-repair elmaradás" modell megmagyarázza, miért használható a Haldane függvény rövid DNS szakaszokra, másrészt az ún. "rövid Holliday kereszt vándorlás-mismatch képződés és repair elmaradás" modell megmagyarázza, hogy miért használható a háromfaktoros térképezési logika ilyen rövid távolságokban, azaz miért nem lép fel az ún. magas negatív interferencia (high negative interference) jelensége (Orosz és mtsai., 1980).

A *c* gén terméke egy represszor fehérje, amely az O_L és O_R operátorokon keresztül fejti ki transzkripciót szabályozó hatását. A C represszor szolgál fő szabályozófehérjeként a fág életciklusa során. A *16-3* C represszor két autonóm doménnel rendelkezik. Ennek a rendszernek a tanulmányozására, Magyarországon elsőként alkalmaztak *in vivo* kísérleti rendszert, elsőként alkalmaztak gél retardációs (EMSA) kísérletet, s kidolgoztak egy tökéletes allélcserét lehetővé tevő eljárást (Dallmann és mtsai., 1987).

A fág helyspecifikus integrációja a *R. meliloti* kromoszómájának meghatározott helyén történik, a *cys46* és a *met5* gén között, az *attB* régiónál. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a *16-3* fág képes speciálisan transzdukálni a *R. meliloti* 41 *cys46* génjét (Sváb és mtsai., 1978, Kiss és mtsai., 1980). Meghatározták a fág integrációs rendszerének elemeit (Olasz és mtsai. 1985, Dorgai és mtsai. 1993, Papp és mtsai. 1993, Semsey és mtsai., 1999, 2002). Az integráció során a gazda *attB* és a fág *attP* helyei között lejátszódó rekombináció a beépült fágot - azaz a profágot - határoló *attL* és *attR* hibrid helyek kialakulásához vezet (Olasz és mtsai., 1985, Papp és mtsai., 1993). A reakciót a fág *int* génje által kódolt *16-3* integráz enzim (*16-3* Int) katalizálja. Az *int* gént tartalmazó DNS szakaszt meghatározták, majd az általa kódolt integráz fehérjéről bebizonyították, hogy a tirozin rekombinázok családjába tartozik (Semsey és mtsai., 1999). A *16-3* fág kivágódása során fontos szerepet játszó *16-3* Xis fehérje génjét (*xis*) azonosították és az *attP* helyet lokalizálták a fág genomján nem messze az *int* gén 3' végétől (Semsey és mtsai., 1999). Az *attB* hely szekvenciájának megismerése felfedte, hogy egy feltételezett *prolin tRNS(CGG)* gén 3' végével van átfedésben oly

módon, hogy a feltételezett tRNS antikodon hurok (loop) része egybeesik az *attB* hely *16-3* Int kötő B és B' szekvenciái közé eső átfedő régióval (Papp és mtsai., 1993). A *prolin tRNS(CGG)* gén aktív marad, ugyanis a fág integrációja során keletkező *attL* régióban helyreáll a *prolin tRNS(CGG)* gén szerkezete és működőképessége sértetlen marad. Ez a finom, szinte sebészi precizitású, integráció a fág és a gazdaszervezet szoros koevolúciós kapcsolatára utal (Blaha és mtsai, 2004).

A lizogén *R. meliloti* felülfertőzéssel szembeni immunitását a *16-3* profág *imm*C, *imm*X és az *avir*T régióinak kölcsönhatása alakítja ki. Az *imm*C régió a lizogén fejlődési út kialakításáért felelős, és átfed a *c* gént és az O_L , O_R operátorokat is tarlalmazó, középső szabályozó régióval. A *imm*X régió két részre osztható: (I) az $X_{U/L}$ rész két nagymértékben átfedő cisztront tartalmaz, melyek a pX_U és pX_L fehérjéket kódolják, míg (II) X_V rész tartalmazza a $X_{U/L}$ represszió, *cisz* elemekből álló, célrégióját. A *imm*X régió szerkezeti felépítését nagyfokú egyedülállóság jellemzi. A lizogén állapot felé vezető genetikai útvonalon az *imm*X aktivitása megelőzi az *imm*C működését (Csiszovszki és mtsai., 2003). Az *avir*T régióról egyelőre azt lehet tudni, hogy kapcsolatban áll az *imm*C és az *imm*X által kifejtett immunitással (Dorgai és mtsai., 1986).

2.2. Helix -turn-helix (HTH) típusú DNS kötő fehérjék

A fágok represszorainál a DNS kötő domén általában a fehérje N-terminális részén található, akárcsak a *16-3* fág esetében is (Dallmann és mtsai., 1987). A HTH motívummal (Pabo és Sauer, 1984) rendelkező represszor fehérjék felépítése nagyon konzervatív a DNS kötő hélixet tekintve. A 20 aminosavból felépülő régió által biztosított DNS kötést már számos esetben leírták és szerkezetét kristályszerkezetek is alátámasztják (McKay és Steitz, 1981, Pabo és Lewis, 1982). A bakteriális és fág HTH típusú represszorokhoz hasonlóan a *16-3* fág 263 aminosav hosszú C represszorában is megtalálható az erre a motívumra jellemző két helix. Az első helix hét aminosavból áll, azután van egy rövid helix-törő "turn" szakasz és a 12-20. aminosavak alkotják a második, felismerő, hélixet. A motívumról általánosságban is elmondható, hogy a 4., 8., 10., 16. és 18. aminosavak hidrofób jellegűek, melyek a fehérje másik hasonlóan hidrofób részével egy zárt hidrofób magot alkotnak (Harrison és Aggarwal, 1990). Az 5. aminosav általában kis oldalláncú glicin vagy alanin, mert a hosszabb oldalláncú aminosav felborítaná a motívum geometriáját.

A hélix-turn-hélix típusú fehérjék felismerő hélix része az, mely a DNS nagy árkába illeszkedve alkot specifikus kapcsolatot a bázisokkal. A HTH represszoroknál a motívumban található mindkét hélix N-terminális része, de főleg az elsőé felelős a nem specifikus DNS foszfát gerinccel kialakított kötéseken keresztül a felismerő hélix helyes pozícionálásáért a specifikus kötőhely felé. A fehérje és DNS komplementaritása, mérete, töltése, alakja határozzák meg összességében a "dokkolási elrendeződést", mely feltétele a specifikus kötésnek. A HTH motívummal bíró represszorok

általában dimerként kötik a célszekvenciájukat, melyek szimmetrikus, palindrom bázis elrendeződést tartalmaznak (Harrison és Aggarwal, 1990).

A szabályozó fehérjék és operároraik illeszkedése során a kötőhelyen belüli kis mértékű változtatás is a teljes funkció elvesztésével járhat a legtöbb leírt rendszerben. Csupán néhány represszor képes az eltérő hosszúságú operátorok felismerésére hasonló affinitással. Ilyen például az *E.coli* ciklikus AMP receptor proteinje (CRP), mely két eltérő hosszúságú operátort ismer fel. A 16 és 18 bp hosszú operátorokat 6 illetve 8 bp centrális spacer választja el egymástól. A DNS-fehérje kapcsolódás során a CRP a kötés kialakulásakor konformáció változást indukál az operátoron. A DNS szerkezete B DNS-ből A-DNS formába alakul át, így lehetővé téve a hosszabb operátor felismerését is anélkül, hogy a "spacer" régióval kialakútana specifikus kapcsolatot a cAMP-CRP komplex (Ivanov és mtsai., 1995). A másik nagyon érdekes represszor a CytR, mely két oktamer ismétlődő szekvenciát ismer fel direkt vagy ellentétes orientációban 2 bp elválasztó résszel szeparálva. A cAMP-CRP komplex jelenlétében a CytR represszor képes felismerni ellentétes orientációban a kötőhelyeit 10-13 bp résszel elválasztva, illetve direkt ismétlődő elrendezésben 1 bázissal szeparálva. Az eltérő kötőhelyek felismerését ebben az esetben a cAMP-CRP complex által a CytR represszoron indukált, fehérje-fehérje kölcsönhatásból eredő konformációváltozás teszi lehetővé (Pedersen és Valentin-Hansen, 1997, Kallipolitis és Valentin-Hansen, 2004) (1. ábra).



1. ábra: A cAMP-CRP complex a CytR represszorhoz kapcsolódva konformációváltozást indukál, ami lehetővé teszi az eltérő operátorok felismerését (Pedersen és Valentin-Hansen, 1997).

Különleges tulajdonságot mutat az operátor felismerésben az *E. coli 186* bakteriofág CI represszora, mely két féle operátorhoz tud kötődni. Az A és B típusnak nevezett oprerátorok közül az A variáns félkötőhelyei 4 illetve 5 bp elválasztó résszel rendelkeznek. A két eltérő operátor kötésében a represszor felismerő hélix eltérő aminosav oldalláncai vesznek részt (Shearwin és mtsai., 2002).

2.3. A 16-3 fág szabályozó régiója

A fág genomon *c* gént meghatározó ORF jobb és bal oldali határoló régióiban találhatók a represszor kötőhelyei. Az operátorokat részlegesen palindrom modulok (O_{L1} , O_{L2} , és O_{R1} , O_{R2}) alkotják. Az O_L operátor a rövidebb térközzel (4 bp) rendelkező szemben a O_R 6 bp interpalindromikus résszel bíró szabályozó elemmel. Az operátorok (O_L és O_R) átfednek a korai gének (P_L és P_R) és magának a represszornak a transzkripciójáért felelős (P_C) promóterekkel (Dallmann és mtsai., 1987, Dallmann és mtsai., 1991, Dorgai és mtsai., 1986, Dudás és Orosz, 1980) (2. ábra).



2. ábra: *16-3* fág jobb és bal oldali operátorai (O_L és O_R) és a jobb illetve bal kromoszómakarok átírását biztosító P_L és P_R promóterek fogják közre a C represszort kódoló cisztront. A P_C promóter biztosítja a C represszor transzkripcióját. A -10 és -35 a promóter boxokat jelöli. A * a virulenciát okozó O_R^C -1 operátor mutáció helyét jelöli (Papp és mtsai., 2002).

Az operátorok palindróm régióinak nukleotidsorrendje nagy hasonlóságot mutat a *434* lambdoid fág operátoraihoz, azonban a C represszornak csupán a HTH része homológ, mintegy 55%-ban fehérje szinten, a *434* fág fő szabályozófehérjéhez (Dallmann és mtsai., 1987). Ráadásul a *16-3* fág represszora képes felismerni a 434 fág operátorát és ugyanezen fág represszora regulálja a *16-3* O_R operátort, azaz a két represszor és operátor keresztregulációra képes (Dallmann és mtsai., 1987; 1991). *In vivo* és *in vitro* módszerekkel meghatározták az operátorok pontos méretét és határait (Papp és mtsai., 2002). Az *in vitro* kísérletek igazolták, hogy az operátorok szimmetrikus csonkolása képes precízen kijelölni a pontos határbázisokat (3. ábra). Ezek alapján O_{L2} operátor ACAAttgaTTGT nukleotidsorrenddel rendelkezik, míg az O_{R2}ACAAttgaTTGT bázissorrenddel.



3. ábra: EMSA kísérletek csonkolt O_{L2} és O_{R2} operátorokkal tisztított C represszor fehérjével. A 4. és 7. csonkolt verziók már nem mutatnak *in vitro* kötést, ami kijelöli az O_{R2} és O_{L2} operátorok fizikai határait. F a szabad (free), B a komplexben kötött (bond) DNS-t jelöli. Az **a** represszor nélkül, **b** 100 ng represszor, **c** 300 ng represszor (Papp és mtsai., 2002).

A két operátor interpalindrom szakasz eltérő hossza érdekes DNS-fehérje illeszkedési mechanizmusok létét tételezi fel. Az *in vivo* mérések eredményeiből kitűnik, hogy ha 1182 bp hosszú növényi DNS fragmentet építettek a két operátor régió közé, ez az architektúra felel meg leginkább az "in phage" szituációnak, akkor a represszió értéke jelentősen megnőtt, ami a két fehérje-operátor komplex közötti kooperációnak az eredménye (Papp és mtsai., 2002).

Az *in vitro* EMSA kísérletek is kimutatták, hogy nagyobb mennyiségű represszor fehérje jelenlétében a vad típusú operátorokkal magasabb rendű un. "sandwich"szerkezet kialakulása figyelhető meg (4. ábra). Ezek az eredmények megerősítik a kooperatív kapcsolatok kialakulásának valószínűségét.

Cirkuláris permutációs analízissel meghatározták a két vad (O_{R2} és O_{L2}) és egy szintetikus, intermedier O_5 operátorok dihedrális hajlítási szögét, ami a represszor hatására bekövetkezett hajlítások össz eredője (4. ábra) (Papp és mtsai., 2002). Az O_5 intermedier szabályozó egység tervezése úgy történt, hogy egy nukleotid hozzáadása az O_{R2} , míg egy bázis elvétele az O_{L2} operátorokat eredményezi. A vad operátorok esetén a dihedrális szög $34 \pm 3^\circ$, míg az O_5 esetében ez 180°.



4. ábra: *16-3* bakteriofág vad, O_{R2} és O_{L2} , operátorok és szintetikus, intermedier, O_5 operátor cirkuláris permutációs elemzése. F a szabad (free), B a kötésben levő, S a sandwich szerkezetet adó fehérje –DNS komplexeket jelöli. A plazmid linearizálását *MluI*, *XhoI* és *NruI* restrikciós enzimekkel végezték (Papp és mtsai., 2002).

A szabad formában egyenes, hajlítatlan operátor részt hordozó DNS az O₅ intermedier operátorral olyan szerkezetet alkot, mely egy képzeletbeli síkban marad. Ennek oka, hogy a két félkötőhely 5 bp, azaz fél helikális "turn", belső szeparációval rendelkezik. A vad operátorok +1 illetve -1 bp hozzáadása illetve elvétele az intermedier operátorhoz, a képzeletbeli síkból való kitörését okozza a szerkezetnek. Az O_{R2} a síkból felfelé, az O_{L2} az ellentétes irányba töri meg a szerkezeti síkot. Az egy nukleotid hozzáadás és elvétel átlagosan ± 36° fokos szerkezeti torzulást okoz a DNS szerkezetben, mely érték gyakorlatilag megegyezik a mért dihedrális szögekkel mindkét vad operátornál (Papp és mtsai., 2002). A komplex eltérő szerkezeteit az biztosítja, hogy a kapcsolódó fehérjék nem rigid, hanem rugalmas illeszkedéssel kapcsolódnak, ami lehetőséget ad a két vad operátor egyformán hatékony kötésére. A komplex leírására javasolt "rotációsan flexibilis protein homodimer modell" az 5A. ábrán látható. A modell szerint a homodimerek térbeli elrendeződése egymáshoz képest eltérő az O_{R2} és O_{L2} operátorokon. A represszor hajlítása más-más irányokban töri meg a síkot a két vad operátor esetében, így tulajdonképpen tükörszimmetrikus elrendeződést mutatnak egymáshoz viszonyítva. Az intermedier operátor a hajlítás során a síkban marad, ahogyan azt a cirkuláris permutáció alapján mért dihedrális szöge is mutatja (4. ábra). Az egyaránt hatékony funkcióért a két vad operátoron a represszor fehérje nagy mértékű rugalmas viselkedése tehető felelőssé.

A rotációsan flexibilis protein homodimer modell esetében az operátor-represszor komplex létrejötte során más vagy azonos dokkolási elrendeződést is mutathat a két operátor a represszor fehérjével. Ennek a feltevésnek eldöntésére végeztük kísérleteinket

Az 5B ábra által javasolt "geometrikus homeosztázis" modell alapján a represszor hajlítása mindkét vad operátor esetében ugyanolyan irányultságot mutat. Ez feltételezhet egy olyan közös dokkolási elrendeződést, mely alapján mindkét operátor ugyanazokat az atomcsoportokat használja a kapcsolódás során. A két vad típusú operátor azonos viselkedése csak azzal magyarázható, ha az operátorok fizikai hossza egyforma. Ezt úgy lehet elképzelni, hogy az O_{L2} "nyúlik" és átalakul O_{R2} hosszúságúvá vagy fordítva, az O_{R2} összetömörödik" és O_{L2} operátorral egyező hosszúságú lesz. Estleg van még egy harmadik lehetőség, mégpedig hogy mindkét vad típusú operátor hossza változik és kialakul egy intermedier méretű szerkezet a represszor-kötőhely komplex kialakulása során. A "geometrikus homeosztázis modell" alapján az O₅ szintetikus intermedier operátornak is hatékonynak kellene lennie a kötés szempontjából. Ennek a kísérleti eredmények azonban ellentmondanak és csak a vad operátorok viselkedésére adhat megfelelő magyarázatot. A modellekben vázolt komplex alkotás pontos mechanizmusa csak a teljes represszor fehérje és a kötőhelyeik kokristályosítása során határozható meg. Ez a jelenlegi módszerekkel nem lehetséges, ezért más megközelítést kell választanunk a DNS-fehérje kapcsolatok tanulmányozására a 16-3 fág esetében. A dolgozatban egy olyan módszert írunk le, mely alkalmas a modell által leírt jelenségek tanulmányozására.



5. ábra: A *16-3* fág operátor-represszor komplex szerkezetének putatív modelljei. A rotációsan flexibilis protein homodimer modell szerint (A) a represszor fehérjék (tojás alakú formák) eltérő módon kapcsolódnak dimerré a vad operátorokon (O_{R2} és O_{L2}). A geometrikus homeosztázis modell szerint (B) a fehérjék dimerizációja a vad operátorokon egyforma.

2.4. Addikciós modulok

A szabadon élő mikroorganizmusok a folyamatosan változó környezeti feltételekhez történő alkalmazkodás érdekében globális reguláló útvonalakat alakítottak ki az evolúció során. Ezek közül a legújabban felfedezett és egyre részletesebben megismert rendszerek az addikciós modulok vagy másnéven toxin –antitoxin rendszerek (TA rendszerek). Lássuk hát röviden, mi is a szerepük a baktériumokban.

A baktériumok aminosav és szénforrás limitáció során képesek csökkenteni az RNS (rRNS, tRNS) szintézist azáltal, hogy növelik a tetrafoszfát (ppGpp vagy P₄G) és pentafoszfátok (pppGpp) intracelluláris koncentrációját. Aminosav éhezés során ezért a RelA, P₄G szintetáz I, fehérje felelős, melynek aktivációját a töltetlen tRNS-ek felhalmozódása végzi (Cashel és mtsai., 1996), míg a szénforrás megvonásánál a P₄G szintézisért a SpoT, P₄G szintetáz II, enzim a felelős (Murray és mtsai., 1996). A sejteket ért stressz során megemelkedett P₄G az RNS polimerázhoz allosztérikusan kapcsolódva csökkenti annak affinitását a promóter régióhoz és ez által azok a promóterek, melyek a tRNS és rRNS szintézisért felelősek rövidebb nyitott állapottal rendelkeznek az mRNS szintézisben résztvevőkhöz képest. Az RNS szintézis ennek következtében eltolódik az mRNS képződés irányába (Chatterji és mtsai., 2001, Barker és mtsai., 2001/A, Barker és mtsai., 2001/B). Az RNS polimerázokon kívül a P₄G gátolják az exopolifoszfatázokat, ami polifoszfátok felhalmozódásához vezet az intracelluláris térben (Kuroda és mtsai., 1997, Kuroda és mtsai., 1999). A polifoszfátok direkt kapcsolódhatnak a riboszómális fehérjéket lebontó Lon (La ATP függő DNS kötő proteáz) proteázhoz, ezzel aktiválják az enzim fehérjebontó funkcióját, ami végső soron az aminosavéhezés során a bakteriális sejtnek endogén aminosavforrást szabadít fel a fehérjeszintézis számára (Kuroda és mtsai., 2001). A stresszhelyzet túlélésének érdekében a P4G képesek még néhány alternatív szigma faktor (Sigma S, N) transzkripcióban történő részvételének gyakoriságát is növelni, ezzel elősegítve a stresszválaszért felelős gének átírását (Jishage és mtsai., 2002, Laurie és mtsai., 2003). Tehát a P₄G –ről elmondhatjuk, hogy kulcsfontosságú, globális szerepet tölt be a sejt életében a megváltozott tápanyagellátáshoz történő alkalmazkodás során (6. ábra).



6. ábra: RelA és SpoT által aktivált P₄G szintézis és szerepe a bakteriális sejt stresszválaszában (Gerdes és mtsai., 2005). RelA: P₄G szintetáz I, SpoT: P₄G szintetáz II, PPX: exopolifoszfatáz, PolyP: polifoszfát, Lon: La ATP függő DNS kötő proteáz

A legtöbb prokarióta genomja a stresszfolyamatokra történő válaszadásban is fontos szerepet betöltő TA géneket tartalmaz. Ezekre a génekre általánosan jellemző, hogy policisztronikusak, legalább két ORF-et tartalmaznak, melyek minimum két fehérjét kódolnak. Egyik gén kódolja az általában enzimatikus funkcióval rendelkező stabil toxint (T), a másik ORF által kódolt instabilabb rövid fehérje az antitoxinnak (A) nevezett alegység pedig specifikusan képes nagyon erősen gátolni a toxin funkcióját. A két alegység specifikusan összekapcsolódva egy toxin-antitoxin (TA) heterodimert komplexet alkot.

Számos már teljesen vagy részlegesen ismert genom összehasonlításával a baktériumok világában megállapíthatjuk, hogy nagyon abundánsak a TA lókuszok az eubaktériumok és az archeobaktériumok körében egyaránt (Gerdes, 2000, Gronlund és Gerdes, 1999, Grady és Hayes, 2003, Mittenhuber, 1999). Érdekes, hogy a szabadon élő mikróbák általában sok, míg az állandó környezetben élő paraziták, patogének kevés fajta TA modult tartalmaznak (Pandey és Gerdes, 2005). Az egyik részről minden bizonnyal rekordernek tekinthető *Nitrosomonas europea* például 45 TA lókuszt tartalmaz a genoforján, melyek szinte minden típusú addikciós modult reprezentálnak a jelen csoportosítás szerint (Pandey és Gerdes, 2005). A két fizikailag teljesen feltérképezett genomú *Mycobacterium tuberculosis* törzs 38 illetve 36 TA lókuszt hordoz a kromoszómán, míg a vele

nagyon közeli rokonságot mutató *M. leprae*, amely obligát sejtparazita, egyetlen ép TA modult sem kódol (Cole és mtsai., 2001). Ugyanezt a TA modul hiányt tapasztaljuk az extrém sejtparazita *Rikettsia* és *Chlamydia* fajok esetében is. A szabadon élő mikróbák közül csupán a *Lactococcus lactis* nem tartalmaz TA modult, amely azonban tejben élő organizmus és mint ilyen nincs rászorulva az állandóan változó környezethez való alkalmazkodásra (Pandey és Gerdes, 2005). Általában elmondhatjuk, hogy a változó abiotikus és nutritív stressznek kitett baktériumok fejlesztettek ki jelentősebb számban adaptív mechanizmust a túlélésre. A TA lókuszok közül sok található plazmidokon is, ami a vizsgált törzsek addikciós modul tartalmát befolyásolhatja.

A bakteriális TA géneknek elsődleges szerepe tehát a környezeti stresszekre adott válasz de a transzkripció és transzláció szabályozásán keresztül szerepük van még a programozott sejthalál beindításában is a baktériumok világában, sőt a plazmidon kódolt TA rendszerek plazmid stabilitási faktorként szolgálnak.

2.5. Plazmidok stabilizációja addikciós modulok segítségével

A bakteriális plazmidok képesek autonóm replikációra így a sejtben több kópia is előfordulhat egy adott plazmidból. A bakteriális sejtek hasadása (segregation) során, húzófonalak és más mechanizmus hiányában, az utódsejtek csak véletlenszerűen tartalmazhatnak plazmidot. A TA modullal rendelkező, általában kis kópiás episzómák úgy biztosítják a túlélésüket, átkerülésüket az utód generációkba, hogy citoplazmában a plazmid kópiaszámához képest a toxin-antitoxin komplexek sokkal nagyobb számban vannak jelen, így ha az utód sejtek nem is tartalmaznak plazmidot, viszont nagyobb valószínűséggel TA fehérjéket igen. Ebben az esetben, mivel a gyorsabban lebomló antitoxin nem szintetizálódik, a toxin alegység felszabadulván az antidotum gátló hatása alól aktiválódik és a toxin típusától függően a sejt pusztulását, vagy legalábbis csökkent anyagcserét okoz (7. ábra). Ez a mechanizmus biztosítja a TA modullal felruházott plazmiddal rendelkező sejtek nagyobb kolonizációs képességét egy adott környezetbe szemben a plazmidmentes sejtekkel. Az első ilyen post-segregational killing (PSK) rendszer részletes működését molekuláris szinten (*mazEF*) Engelberg-Kulka jellemezte (Engelberg-Kulka és Glaser, 1999.)



7. ábra: Plazmid stabilizálás (PSK) TA modul által (Buts és mtsai., 2005)

A TA rendszereket nyolc csoportba sorolják aszerint, hogy plazmidon v. kromoszómán lokalizálódnak-e, hogy milyen fiziológiás szerepet töltenek be és milyen baktériumok körében találhatók (1. táblázat).

1. táblázat Addikciós modulok felosztása

TA lókusz	Toxin	Toxin target	Antitoxin	Proteáz	Előfordulás
ccd	CcdB	DNS giráz	CcdA	Lon	G-
relBE	RelE	mRNS hasítás	RelB	Lon	G-, G+, Arch
parDE	ParE	DNS giráz	ParD	nem ismert	G-, G+
higBA	HigB	nem ismert	HigA	nem ismert	G-, G+
mazEF	MazF/ <u>PemK</u>	mRNS hasítás	MazE/ <u>PemI</u>	ClpXP/Lon	G-, G+
phd/doc	Doc	transzláció	Phd	ClpAp	G-, G+, Arch
vapBC	VapC	nem ismert	VapB	nem ismert	G-, G+, Arch
ω- ε- ζ	ζ	nem ismert	3	nem ismert	G+

2.6.1. Az F plazmid ccd lókusza

Gram negatív fajokban leírt plazmidstabilitási rendszerek a replikációs origó környékén helyeződnek az F plazmidnál és a vele hasonló replikonnal rendelkező episzómáknál (Ogura és Hiraga, 1983, Boe és mtsai., 1987, Gerdes, 1995). A plazmidmentes utódsejtek szaporodását gátolják a replikációs és transzkripciós folyamatokban nélkülözhetetlen DNS giráz gátlásán keresztül a citoplazmában jelen levő CcdB toxin fehérjék. Ez a gátlás kétféle mechanizmus alapján megy végbe. Az egyik során a CcdB toxin képes komplexet alkotni a DNS giráz fehérjékkel és ezáltal stabilizálja a kovalensen kötött giráz-DNS komplexet, ami direkt blokádot jelent a T7 polimeráz számára in vitro transzkripciós reakcióban. Ez a gátlás CcdA antitoxin hozzáadással feloldható (Critchlow és mtsai., 1997). A másik módja a gátlásnak a toxin nem kovalens komplex alkotásán keresztül valósul meg szabad girázA (GyrA) alegységekkel (Maki és mtsai., 1992, Jiang és mtsai., 2002). Mindkét gátlás ugyanazon gyrA mutációval feloldható (Critchlow és mtsai., 1997, Bernard és mtsai., 1993, Bahassi és mtsai., 1995). Nagyon érdekes, hogy a CcdB toxin strukturálisan nagyon közeli rokona a transzkripciót az mRNS hasítással gátolni képes MazF családba tartozó toxinoknak, ennek ellenére RNS bontásra nem képes jelen ismereteink szerint (Hargreaves és mtsai., 2002, Kamada és mtsai., 2003).



8. ábra: CcdB toxin képes gátolni a DNS giráz működését. GyrA és GyrB a giráz enzim alegységei (Buts és mtsai., 2005).

2.6.2. A relBE gének

A kromoszómális *relBE* génekről a RelE toxin és a RelB antitoxin fehérjék íródnak át, melyek együtt nem toxikus komplexet alkotnak (Gotfredsen és Gerdes, 1998, Galvani és mtsai., 2001). Az egyik legnépesebb TA csoport, melynek toxin tagjai (RelE) mRNS hasításon keresztül befolyásolják a transzlációt és csökkentik a sejtek szaporodását (Gotfredsen és Gerdes, 1998, Christensen és mtsai., 2001, Pedersen és mtsai., 2002). A toxin a riboszóma A kötőhelyénél képes az mRNS molekulákat hasítani *in vitro* és *in vivo* egyaránt (Pedersen és mtsai., 2003, Christensen és Gerdes, 2003). A vágás során kodon preferenciát is tapasztaltak, hiszen az UAG és UAA helyeken 800 illetve 100 szorosa a hasítási gyakoriság az UGA stop kodonhoz viszonyítva ezen kívül a hasítási helyek mindíg a kódoló régiókat fedik le (Pedersen és mtsai., 2003).

A CFU csökkenésének ellenére nem feltétlenül pusztulnak el a sejtek a túltermelő törzsek esetében sem (Pedersen és mtsai., 2002). Érdekes hogy némely kromoszómális *relBE* gén terméke képes plazmid stabilitási faktorként is működni bizonyos replikonokkal kölcsönhatva (Gotfredsen és Gerdes, 1998), melynek pontos folyamata még nem kellően tisztázott. A csoportban vannak olyan a *relBE* génekkel nagy homológiát mutató TA rendszerek, melyek episzómákon találhatók és klasszikus plazmid stabilitást növelő faktorok (Smith és Rawlings, 1997, Gronlund és Gerdes, 1999).

2.6.3. Az Rts1 plazmid higBA rendszere

Az Rts1 plazmid *higBA* (host inhibition of growth) lókusza kódolja a HigB toxint és a HigA antitoxin fehérjéket (Tian és mtsai., 1996). Ez a típusú TA modul plazmid stabilitási faktorként hat, a plazmidmentes sejtek növekedését gátolja. A gátlás pontos módja még nem ismert. Ellentétben más addikciós modulokkal a toxin fehérjét kódoló ORF 5' irányban található a kromoszómán az antitoxinéhez képest. A más TA rendszerek közül a HigB legközelebbi rokona a RelE csoportja,

melyhez jelentős hasonlóságot mutat, de az antitoxin fehérjék teljesen más típusú DNS kötő protein családba tartoznak (Pandey és Gerdes, 2005).

2.6.4. Az RK2 plazmid parDE génjei

Az RK2 széles gazdaspecificitású plazmid stabilitási rendszereként szolgáló *parDE* TA modul a *ccdBA* rendszerhez hasonlatosan a DNS giráz gátlásán keresztül a növekedésre gyakorolt negatív hatásával csökkenti a plazmidmentes utódsejtek szaporodását (Roberts és mtsai., 1994, Sobecky és mtsai., 1996). A TA modul stabilizációs hatását fajspecifikus faktorok is befolyásolják (Sia és mtsai., 1995). A ParE toxinfehérje szintén jelentős homológiát mutat a RelE toxinhoz, de érdekes, hogy más a celluláris hatásmechanizmusa (Pandey és Gerdes, 2005).

2.6.5. A pemIK és mazEF (chp) lókuszok

Az ebbe a családba tartozó addikciós modulok a legjobban ismertek és tanulmányozottak. Az R1 és R100 replikonnal rendelkező plazmidok stabilitási komplexei (Bravo és mtsai., 1987, Tsuchimoto és mtsai., 1988), kis/kid (killing suppressor és killing determinant) és a pemIK (plasmid emergency maintenance), és ezek kromoszómális homológjai, chpA és chpB (chromosomal homologues of pem) lókuszok (Masuda és mtsai., 1994, Masuda és mtsai., 1993, Metzger és mtsai., 1988) klasszikus TA elrendeződést mutatnak. A chpA lókuszt legújabban mazEF néven ismertetik. A MazF toxin a bakteriális programozott sejthalál folyamataiban is részt vesz, többek között a sejt energiaháztartásában eszenciális mazG és era génekről képződő mRNS-ek szekvencia specifikus hasításán keresztül fejti ki citotoxikus hatását (Zhang és mtsai., 2003, Zhang és mtsai., 2005). A pem és kis/kid rendszerek szintén képesek mRNS szekvencia specifikus hasítására de nem feltétlenül pusztítják el a sejtet, ellenben jelentősen csökkentik a plazmidmentes utódgeneráció növekedését (Jensen és mtsai., 1995). A RelE toxinnal ellentétben a PemK toxin nem igényli a riboszóma jelenlétét az mRNS hasítása során. A tisztított MazF fehérje az ACA helyen hasítja az mRNS-t (Zhang és mtsai., 2003, Zhang és mtsai., 2005). A hasítás fiziológiás körülmények között nagyobb valószínűséggel történik a kódoló régióban, ami a riboszómák befolyásoló szerepét is valószínűsíti a vágási folyamatban (Christensen és mtsai., 2003). A MazEF hatásmechanizmusában részt vesz egy pentapeptid (NNWNN), mely kikerülve az extracelluláris térbe a szomszédos sejtekben TA modul aktivációt okozva, nem direkt hatva a toxin-antitoxin alegységre, a sejtek pusztulását okozza (Kolodkin-Gal és mtsai., 2007). A tisztított peptid (extracellular death factor, EDF) az E. coli sejttenyészethez adva önmagában is jelentős CFU csökkentő hatással bír (Kolodkin-Gal és mtsai., 2007).

2.6.6. A phd/doc TA rendszer

A *P1* profág a sejtben egy genetikailag stabil, extrakromoszómális replikonként viselkedik. Stabilizációjának egyik faktora a *phd/doc* lokusz. A *doc* (death on curing) gén kódol egy toxin fehérjét, Doc, a *phd* (prevent host death) allél pedig egy antitoxin fehérjét, Phd, kódol, amely képes semlegesíteni a Doc fehérjét (Lehnherr és mtsai., 1993). A plazmid stabilizációs hatás más TA rendszerekhez hasonlóan az antitoxin alegység lebomlásán és ezáltal a toxin felszabadulásán keresztül valósul meg (Lehnherr és mtsai., 1995). Az addikciós modul Phd2Doc trimer komplexet alkot (Gazit és Sauer, 1999). Kromoszómális homológjai is megtalálhatók számos baktériumban. Indirekt bizonyítékok arra utalnak, hogy a transzláció gátlásán keresztül fejtik ki növekedésgátló hatásukat az ebbe a csoportba sorolt addikciós rendszerek (Hazan és mtsai., 2001).

2.6.7. vapBC lókuszok

A *vapBC* (virulence associated protein) rendszereket és homológjait legelőször a *Salmonella dublin* (Pullinger és mtsai., 1992) és *Shigella flexneri* (Sayeed és mtsai., 2000) fajokon írták le, mint virulenciafaktorokat hordozó plazmidok stabilitási rendszereit. A VapB antitoxin neutralizációja az adott plazmid elvesztését okozza a vizsgált törzsekben és növekedéscsökkenéssel vagy akár pusztulással is végződhet a plazmidmentes utódsejteknél (Sayeed és mtsai., 2000). Nagyon népes család mind az eubaktériumok mind az archeobaktériumok körében egyaránt. A VapC toxin hatásának molekuláris mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, az azonban nagyon érdekes, hogy mindegyikre jellemző a PIN (domain homologues to the N-terminal domain of the pilin biogenesis protein PiIT) domén megléte (Anantharaman és Aravind, 2003). Az eukarióták körében ez a PIN domént tartalmazó fehérjecsalád olyan ribonukleázokból áll, melyek az NMD (nonsens-mediated mRNA decay) és RNS interferencia folyamatokban vesznek részt (Clissold és Ponting, 2000). Ez egy lehetséges evolúciós kapcsolat lehet a génexpressziós minőségbiztosítási rendszereknél az eltérő szerveződési szintű organizmusok esetében (Anantharaman és Aravind, 2003).

2.6.8. Az ω- ε- ζ lókusz

A *Streptococcus pyogenes* széles gazdaspecificitású pSM19035 plazmidjának TA rendszere egyedülálló a felépítése miatt, ugyanis három fehérje alkotja az addikciós rendszert. A Ω represszor képes autoregulálni az egész ω - ε - ζ operont (de la Hoz és mtsai., 2000). Az ε kódol egy antitoxint és a ζ egy toxin alegységet (Ceglowski és mtsai., 1993, Camacho és mtsai., 2002). A toxin antitoxin általi gátlása egy fehérje-fehérje kapcsolaton keresztül valósul meg (Meinhart és mtsai., 2003) és a toxin aktivációja az antitoxin proteáz általi inaktivációval történik (*in vivo*) (Camacho és mtsai., 2002), amint az elvárható egy kanonikus TA rendszertől. Ez a TA rendszer is a transzkripcó-transzláció, még ismeretlen mechanizmus alapján történő gátlásán keresztül fejti ki hatását, jelentősen csökken a túlélő sejtek száma az antitoxin neutralizációjának következtében (Meinhart és mtsai., 2003). Csak a Gram -pozitív baktériumok körében fordul elő ez a fajta addikciós rendszer.

2.7. Két speciális csoport

2.7.1. A II. típusú restrikciós- modifikációs (RM) rendszerek

Ez egy speciális csoport, mely plazmidon és kromoszómán egyaránt megtalálható minden baktériumban és főleg a saját és idegen DNS megkülönböztetést szolgálja a sejtek életében (Chang és Cohen, 1977, Bickle és Kruger, 1993), ezáltal a fágfertőzések leküzdésének komponense. Az egyik alegység képes metilálni a target, általában hemimetilált konjugációval bejutott vagy replikáció során keletkezett, DNS-t és ezáltal a vele komplexet alkotó DNS hasító restrikciós endonukleáz nem képes a metil csoport miatt kifejteni a katalitikus aktivitását. Metilálatlan kettős szálú DNS-t -fágfertőzés, plazmid vagy bármilyen más idegen nukleinsav bejutása- az endonukleáz elhasít és az így degradálódik. A plazmidon kódolt RM rendszerek nagyon hatékony plazmid stabilitási faktorként működnek és a plazmidmentes utódsejteket elpusztítják (Naito és mtsai., 1995).

2.7.2. A hipBA lókusz

A baktériumok antibiotikum kezelés hatására és számos stresszhatásra adott válaszukként un. perziszter sejteket hoznak létre. Ez a baktérium populációban 10^{-6} gyakorisággal kialakuló speciális anyagcserével jellemezhető fiziológiai állapotú sejtvonal képes a stresszhatások túlélésére oly módon, hogy mintegy "alvó", rezisztens, állapotba vonulva az anyagcsere folyamatokat leállítja. A perziszter sejtek képződése szorosan összefügg a P₄G szintézissel és ezen metabolitok intracelluláris szintjének emelkedésével. A pontos mechanizmus még nem ismert de a transzkripció, transzláció, replikáció, DNS szintézis leállítása kimutatható volt a perziszter sejt képződés során (Korch és mtsai., 2003). Az irodalom megkülönböztet I. típusú perziszter sejteket, melyek a stacioner fázisban fiziológiás kondíciók mellett képződnek és II. típusúakat, melyek bármilyen fázisban keletkezhetnek stressz hatására (Korch és mtsai., 2006)

Az *E. coli* néhány plazmidján leírt *hipBA* (high persistence) lókusz két polipeptidet kódol: a HipB antitoxint, autoregulációért felelős represszort és a vele komplexet alkotó HipA toxint (Black és mtsai., 1994, Falla és Chopra, 1999). A funkcióképes hipA allélt hordozó *E. coli* törzsekben a toxin antidotum nélküli túltermeltetése a citoplazmában növeli az I. típusú perziszter sejtek képződésének arányát az antibiotikum kezelés hatására, akár 10⁻² –re is nőhet a perziszter képződés gyakorisága (Black és mtsai., 1991). A toxint túltermelő sejtek a stressz (penicillin kezelés) hatására nagyon lassan szaporodnak. Ez a növekedés a leglassabb a stacioner fázisba lépő sejtek esetében, melyek friss médiumba történő átoltás hatására elvesztik "alvó" állapotukat (Balaban és mtsai., 2004).

A perziszter sejt képződés mechanizmusának megismerése nagyon értékes lehet orvosi és peszticidkémiai vonatkozásban az új bakteriosztatikumok kifejlesztése során.

2.8. Szerkezet és reguláció az addikciós modulok körében

A TA modulok antitoxin alegységei képesek kötődni az addikciós modult 5' irányban megelőző promóter-operátor régióhoz, ezáltal az egész egység transzkripcióját, mint represszor, képes szabályozni a toxinnal, mint korepresszorral, együttműködve (Afif és mtsai., 2001, Santos-Sierra és mtsai., 2002, Zhang és mtsai., 2003, Smith és Magnuson, 2004, Lemonnier és mtsai., 2004). Általában elmondható, hogy a kis méretű antitoxin polipeptid N-terminális része tartalmazza a nagyon változó felépítésű DNS kötő motívumot (2. táblázat). A toxin gátlásáért felelős motívum szeparált a DNS kötő egységtől az antitoxinon belül (Smith és Magnuson, 2004). A represszióban a direkt DNS-fehérje interakció során csakis kizárólag az antitoxin vesz részt, míg a toxin alegység csak ko-represszorként szerepel stabilizálva a DNS-fehérje komplexet és hatékonnyá teszi a transzkripció gátlását (Gotfredsen és Gerdes, 1998, Zhang és mtsai., 2003, Marianovsky és mtsai., 2001, Magnuson és Yarmolinsky, 1998). Az antitoxin önmagában *in vitro* körülmények között (EMSA kísérletek) csak magas koncentrációban képes kötődni az operátorhoz, amely kötés affinitását a toxin jelenléte nagymértékben növeli (Afif és mtsai., 2001, Bodogai és mtsai., 2006). Ez alól az egyik kivétel a ParD antitoxin, mely egymagában is képes gátolni a *parDE* operon transzkripcióját.

A transzkripciós gátlás hatékonysága függ a toxin és antitoxin arányától. A CcdA2-CcdB2 tetramer hatékonyan képes kötődni az operátorához, ellentétben a hexamer (CcdA2-CcdB4) formációval

(Afif és mtsai., 2001, van Melderen és mtsai., 1994). Általában elmondható, hogy a toxin túl magas koncentrációja csökkenti *in vivo* és *in vitro* körülmények között az egész TA komplexnek az affinitását az operátorhoz. Ezt a megfigyelést támasztja alá a ParDE addikciós rendszer viselkedése *in vitro* kísérletekben magas ParE koncentráció esetében (Johnson és mtsai., 1996) és a *phd/doc* TA rendszer elemeinek működése magas Doc fehérje koncentráció esetében (Magnuson és Yarmolinsky, 1998).

A DNS oldalról megközelítve a fehérje-operátor kapcsolatot, általában a kötőhely architektúrája direkt ismédlődő szekvencia, mint a *vapBC* családba tartozó *ntrPR* TA rendszer esetén (9. ábra) (Bodogai és mtsai., 2006) vagy fordítottan ismétlődő (inverted repeat, palindrom) régió, mint a *phd/doc*, és *pemIK* rendszer esetében (Gazit és mtsai., 1999, Tsuchimoto és mtsai., 1988). Nagyon érdekes a mazEF TA rendszer operátora, melyben három kötőhely található. A fehérjék MazE3-MazF2 pentamert alkotnak (9. ábra). A toxin ebben az esetben is csak korepresszorként, stabilizáló kereszthídként szolgál (Marianovsky és mtsai., 2001).

A.

E. coli mazEF operátor régiója. A három kötőhely, két direkt és egy fordított ismétlődő rész, lefedi a két promótert (P₂ és P₃). A MazF korepresszor nem vesz részt a DNS kötésben, csak a MazE. -10 és -35 a promóter elemei (Buts és mtsai., 2005).



B.

E. coli pemIK 18 bp hosszú operátora két (9-9) teljesen szimmetrikus palindromból áll (aláhúzott nukleotidok), mely átfed a -10 promóter régióval (Masuda és mtsai., 1994). -35 -10

TGGTGT GTTTTTTTAGTGGAT GTTATATTTAAATATAAC TTTTATGGAGGTGAAGAATG

C.

R. meliloti ntrPR operonja egy 4 bp által elválasztott direkt ismétlődő szekvenciából áll. Az egyik félkötőhely átfedő a transzkripciós startponttal (Bodogai és mtsai., 2006).



D.

A CcdB és CcdbA fehérjék szerkezete az operátoron.



9. ábra: Operon szerkezetek a TA modulok körében

A sejtben jelen levő stabil TA komplex csak akkor képes ellátni funkcióját, toxin aktiváció, ha az antidotumként szolgáló antitoxin lehasad a komplexről. A legtöbb esetben ezt a stresszor által aktivált fehérje végzi. Ilyen például a Lon proteáz, mely aminosav éhezés során és stacioner fázisban aktiválódik, illetve a hibás fehérjéket degradálja. Ez a proteáz képes specifikusan bontani a RelB antitoxint és ezáltal aktiválni a RelA toxint (Christensen és mtsai., 2001, Christensen és Gerdes, 2004). Viszont a MazE antidotum inaktivációját a ClpXP (caseinolytic protease) végzi stacioner fázisban (Aizenman és mtsai., 1996) de indirekt bizonyítékok vannak arra nézve, hogy aminosav éhezés során a Lon proteáz is képes inaktiválni az antitoxint (Christensen és mtsai., 2003).



10. ábra: Addikciós modulok génszerveződése és sematikus ábra az autoregulációról. Fekete az antitoxin, szürke a toxin cisztron (a). A *mazF/pemK* család egy promóterrel rendelkeznek az antitoxint 5' megelőző irányban (b). A *higB* és *higA* cisztronok átírása külön történik, közös autoregulációval (c). Itt a toxin cisztron (*higB*) 5' irányban, tehát felborítva a klasszikus TA elrendezést, található az antitoxinhoz (*higA*) képest. A *higA* promóter átfed a *higB* ORF-el. Mindkét promótert a TA komplex autoregulálja. Az ω - ε - ζ lókusz három cisztronja közül a ε és ζ külön promóterrel rendelkezik (d). Az Ω fehérje képes regulálni a ε antitoxin és ζ toxin transzkripcióját.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált baktériumtörzsek és bakteriofágok

<i>E.coli</i> DH5α	Hanahan, 1983
E.coli BL21(DE3) pLys3	Novagen
Rhizobium meliloti 41	Szende és Ördögh, 1960
Agrobacterium tumefaciens C58	Cereon
$\lambda RS45$ fág	Simons és mtsai., 1987
<i>16-3</i> fág	Orosz és Sík, 1970

3.2. Felhasznált plazmidok

<u>név</u>

rezisztencia referencia pCU101 Cm Thatte és mtsai., 1985 Banerjee és mtsai., 1992 pCU996Ω Sp/Str pMLB1109 Papp és mtsai., 1993 Amp Km pRK2013 Figurski és Helinski, 1979 pSEM155 Km Ferenczi és mtsai., 2004) Km Ferenczi és mtsai., 2004 **pSEM289** Km Ferenczi és mtsai., 2004 pSEM211 pSEM91 Km Semsey és mtsai., 1999 pPM232 Km Papp és mtsa., 2002 Km pPM238 Ferenczi és mtsai., 2006 Ferenczi és mtsai., 2004 pGSB1 Sp pGSB42 Sp Ferenczi és mtsai., 2004 pGSB62 Ferenczi és mtsai., 2004 Sp Guzman és mtsai., 1995 pBAD24 Amp pAPR1 Amp, pGSB1 Acc65I Klenow+ pemPR up és pemPR low 133 bp fragment pAPR11 Amp, pGSB1 Acc65I Klenow+ pemPR up és pemPRK low 455 bp fragment

pAPR2 Amp, pMLB1109 Acc65I Klenow+ pemPR up és pemPR low 133 bp fragment

pPIK1	Amp, pBAD24 NcoI-BamHI + IbadNco- pemKlowBam fragment						
pPI1	Amp, pBAD24 NcoI-BamHI + IbadNco- pemIlowBam fragment						
pPK1	Amp, pBAD24 NcoI-BamHI + KbadNco- pemKlowBam fragment				fragment		
pET 16		A	mp				Novagen
pET 22		A	mp				Novagen
pETI16	Amp,	pET16	NdeI-BamHI+pemI	antitoxin,	N-term.	His-Tag	(pemINde-
pemIlowBam	fragmen	nt)					
pETK22	K22 Amp, pET22 NdeI-BamHI+pemK toxin, C-term. His-Tag (pemKNde up-pemKNotH				-pemKNotH		
fragment)							
pEIK22	Amp,	pET22 N	<i>NdeI-Bam</i> HI+pemI na	atív és pen	nK C-term	n. His-Tag	(pemINde-
pemKNotH fr	agment)					
pPRM1		Amp, pM	ILB1109 Acc65I Klene	ow+apr low	és apr up sz	zint. oligon	ukl.
pPRM2		Amp, pM	ILB1109 Acc65I Klene	ow+aprac3lo	w és aprac	3up szint. c	oligonukl.
pPRM3		Amp, pM	ILB1109 Acc65I Klene	ow+aprtg4 lo	w és aprtg	4 up szint.	oligonukl.
pK22		Amp, pE	T 22 NdeI-BamHI+per	mK toxin (pe	emKNdeup	- pemKlow	(fragment)
pI22		Amp, pE	T 22 NdeI-BamHI+per	mI toxin (per	nINde- per	mIlow frag	ment
pIK22		Amp, pE	T 22 <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI+ pe	mIK toxin (J	pemINde- j	pemKlow f	ragment)

3.3. Oligonukleotidok

	5`	3`
Sp6 up	ttgactacaattgtagttgtatatagt	
Sp6 low	actatatacaactacaattgtagtcaa	
Sp4 up	ttgactctacaattgattgtatatagt	
Sp4 low	actatatacaatcaattgtagtcaa	
CM-E low	ggccggcaaataggttgttgatcgcctgggcgctttg g	
XbaIrep5	gataatctagaatgcataaagggacatttcac	
CMlsI-EagI up	c caa age nnn nnn geg ate aac aac eta ttt ge	c
CMlsI-EagI low	ggcc ggc aaa tag gtt gtt gat cgc nnn nnn gct	t ttg g
Ala1 up	c caa age gee cag geg ate aac aac eta ttt gee	;
Ala1 low	ggcc ggc aaa tag gtt gtt gat cgc ctg ggc gct	ttg g
Ala2 up	c caa age caa gee geg ate aac aac eta ttt gee	, ,
Ala2 low	ggcc ggc aaa tag gtt gtt gat cgc ggc ttg gct t	ttg g
Ala4 up	c caa age caa cag geg gee aac aac eta ttt gee	С
Ala4 low	ggcc ggc aaa tag gtt gtt ggc cgc ctg ttg gct	ttg g

Ala5 up	c caa agc caa cag gcg atc gcc aac cta ttt gcc
Ala5 low	ggcc ggc aaa tag gtt ggc gat cgc ctg ttg gct ttg g
Ala6 up	c caa agc caa cag gcg atc aac gcc cta ttt gcc
Ala6 low	ggcc ggc aaa tag ggc gtt gat cgc ctg ttg gct ttg g
Ala7 up	c caa agc caa cag gcg atc aac aac gcc ttt gcc
Ala7 low	ggcc ggc aaa ggc gtt gtt gat cgc ctg ttg gct ttg g
pemPR up	gcggaagccggttattc
pemPR low	cctggcgtcttattttcgtg
pemPRK low	ttegteettgatttegetgeetae
lacZprex	ggcgcgcccccgggtacc
IbadNco	catgccatggccgtgaccacgaaaataa
KbadNco	catgccatggtccgcaaccagatccccaagc
pemIlowBam	cgggatccctatcacaacgcttctttgccgaca
pemKlowBam	cgggatcctcaagctggatcgatcatgc
pemINde	ggaatteeat atgacegtgaceaegaaaataaga
pemKNotH	ataagaat gcggccggatcgatcatgctgatga
pemKNde up	ggaatteeatatggteegeaaceagateeeeaage
apr up	aattettgacatcatgatgatetgtgetacatatgttgeacag
apr low	gtacctgtgcaacatatgtagcacagatcatcatgatgtcaag
aprac3 up	$a attett gacat cat gat gat cag t get a cat at g t t g cac \underline{c} g$
aprac3 low	gtaccggtgcaacatatgtagcactgatcatcatgatgtcaag
aprtg4 up	aattettgacateatgatgatetgttetacatatgttggacag
aprtg4 low	gtacctgt <u>c</u> caacatatgtag <u>a</u> acagatcatcatgatgtcaag

3.4. Baktériumok tenyésztéséhez használt táptalajok

Az *Escherichia coli* és *Agrobacterium tumefaciens* baktériumtörzsek szaporításához LB (Sambrook és msati., 1989) komplett tápoldatot és 1,5% agart tartalmazó LB-t, mint szilárd táptalajt, használtunk. A *R. meliloti* törzseket GTS (Kiss és mtsai., 1980) minimál táptalajon növesztettük. A kísérletek folyamán az *E. colit* 37°C-on, a *R. meliloti* 41-et és az *A. tumefaciens* C58-at 28°C-on szaporítottuk. A szelekcióra használt antibiotikumokat a következő végkoncentrációkban alkalmaztuk:

ampicillin: 100 µg/ml; spektinomicin: 50 µg/ml; kloramfenikol 20 µg/ml (E.coli)

kanamicin: 30 μg/ml (*E. coli*), 400 μg/ml (*R. meliloti*), 100 μg/ml (*A. tumefaciens*); spektinomicin: 100 μg/ml (*A. tumefaciens*, *R. meliloti*)

3.5. A plazmidba épített fragment fágba juttatása homológ rekombinációval (Simons és mtsai., 1987)

A pMLB1109 plazmidba építettük a promótert tartalmazó szintetikus oligonukleotidokat, majd 2% maltózt tartalmazó YTB, folyadékban éjszakán át felnövesztett (10^{8} CFU/ml) pMLB1109 plazmid származékát tartalmazó *E.coli* sejtekhez CaCl₂ és MgCl₂ adtunk 10 mM/ml végkoncentrációban majd λ RS45 fágtörzzsel felülfertőztük (10^{8} PFU/ml, multiplicitás =1). Az optikai denzitást félóránként mértük, majd amikor már nem csökkent tovább (baktériumok lízisének,"burst", vége) tized térfogat kloroformmal leállítottuk a fertőzést. Centrifugálás után a fágokat titráltuk baktérium pázsiton és a kék, rekombináns fággal fertőzött plakkból a lizogén baktériumokat szélesztéssel egy telepre tisztítottuk, majd kompetens sejteket állítottunk elő (Mandel és Higa, 1970).

3.6. Plazmid DNS bejuttatása baktériumsejtekbe

3.6.1 Bakteriális sejtek transzformálása

A transzformáláshoz használt *E. coli* kompetens sejtek előállítása Mandel és Higa módszere szerint történt (Mandel és Higa, 1970). Transzformáláskor a mélyhűtött kompetens sejteket 10 percig jégen tartva felolvasztottuk, majd a plazmid DNS hozzáadása és rövid keverés után 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 2,5 perces hősokkot alkalmaztunk 42°C-on, majd 5 percig jégen inkubáltuk a mintákat. Szelektív táptalajra szélesztés előtt 40 percig, LB tápoldatban regeneráltuk a sejteket, 37°C-on.

3.6.2. Konjugáció (három szülős)

A plazmid DNS recipiens sejtekbe juttatásához az *E. coli* DH5α törzsét használtuk donorként. A folyamathoz a pRK2013 vagy a pCU101 plazmidot tartalmazó konjugációs helper törzseket alkalmaztuk. A donor, a recipiens és a helper sejteket szilárd táptalajon -egy éjjelen át- együtt inkubáltuk 28 °C-on, majd a mintákat antibiotikumot tartalmazó LA vagy GTA táptalajra szélesztettük.
3.7. Plazmid DNS tisztítása

A plazmid DNS tisztítását alkalikus feltárással végeztük (Birnboim és Doly, 1979). A nukleotidsorrend meghatározáshoz szükséges nagyobb tisztaságú DNS-t, a QIAGEN cég által gyártott Qiaprep plazmid miniprep kittel izoláltuk. A munka során a gyártó utasítása szerint jártunk el.

3.8. Totál-DNS preparátum készítése

Kései logaritmikus fázisig növesztett baktériumkultúrából 1,5 ml-t centrifugálás után 100 µl TE oldatban (50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA) szuszpendáltunk, majd 10 µl lizozim hozzáadása után 20 percig jégen inkubáltunk. A mintákat 25 µl STE (5 mM Tris HCl pH 8, 300 mM EDTA, 0,5% SDS) és 25 µl Proteináz K (10 mg/ml) hozzáadását követően 15 percig inkubáltuk 50°C-on. A mintákhoz 300 µl vizet, majd 100 µl fenolt és ugyanennyi kloroformot adtunk. Óvatos keverés, majd 10 perces 15000 ford./perc végzett centrifugálás után a felső fázishoz, új csőben, 400 µl dietil-étert mértünk. Keverést és 10 perces centrifugálást követően, az alsó fázist fenolos/kloroformos, majd kloroformos kezeléssel tisztítottuk. A DNS-t 40 µl 5 M kálium-acetát és 1 ml izopropanol hozzáadásával csaptuk ki. A preparátumot 75% etanolban mostuk, majd a beszárítást követően 100 µl desztillált vízben felvettük.

3.9. Totál-RNS preparátum készítése

A bakteriális totál RNS mintákat QIAGEN RNeasy Mini Kittel a gyártó előírásai szerint végeztük.

3.10. DNS minták emésztése restrikciós endonukleázokkal

A DNS mintákat a gyártó által javasolt pufferekben, 20-50 µl végtérfogatban, 1-16 órán át emésztettük. Több enzimmel való együttes emésztés esetén olyan puffert választottunk, amelyben a felhasznált enzimek legalább 75%-os hatékonysággal működnek. Az emésztéseket az adott enzimhez előírt hőmérsékleten 2-10 U enzim felhasználásával végeztük.

3.11. DNS fragmentumok elválasztása

A restrikciós emésztés és a PCR során keletkező DNS fragmentumokat 0,7-1,0%-os agaróz vagy 2-3%-os NuSieve (FMC) gélen választottuk el. A gélelektroforézist TBE pufferben (90mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20mM EDTA) végeztük, 1 mg/l etidium-bromid jelenlétében. Az elválasztás eredményét UV fényben tettük láthatóvá.

3.12. DNS fragmentumok izolálása agaróz gélből

A DNS fragmentumok izolálására a QIAEX II Gel Extraction kit-et használtunk. A munka során a gyártó utasításait tartottuk szem előtt.

3.13. Szintetikus oligonukleotidok plazmidba építése

A szintetikus oligonukleotidokat azonos moláris mennyiségben összekevertük *fmol* Sequencing kit (Promega) 1x pufferben, majd 80 °C-os vízfürdőben 2 percig inkubáltuk. Ezt követően hagytuk kihűlni szobahőmérsékletig. A ligálási reakció után a folyamatot megismételtük és a plazmidoligonukleotid ligátumot kompetens sejtekbe juttattuk transzformációval.

3.14. DNS fragmentumok ligálása

A klónozáshoz elengedhetetlen ligálási reakció 20 μl végtérfogatban ment végbe, amely szobahőmérsékleten ragadós végek esetén 1 órát, tompa végek esetén két órát vett igénybe. A reakciót T4 DNS ligáz (Fermentas vagy Promega) katalizálta (1 Weiss unit/ rekció).

3.15. DNS nukleotidsorrend meghatározása

A DNS nukleotidsorrendet didezoxi-terminációs módszerrel határoztuk meg (Sanger és mtsai., 1977). Az *fmol* Sequencing kit (Promega) használatakor a gyártó utasításai alapján állítottuk össze a reakciókat. A radioaktív jelölést $[\alpha - {}^{32}P]$ dATP direkt inkorporációval, illetve a DN-áz footprinthez használt molekulatömeg marker esetében végjelölt primer felhasználásával végeztük. A radioaktívan jelölt fragmentumokat 6%-os denaturáló (8 M urea, 38:2 akrilamid-biszakrilamid)

poliakrilamid gélen választottuk el. Az elválasztás során 1xTBE puffert 70 W teljesítményt és 40 mA áramerősséget használtunk.

3.16. Transzkripciós starthely meghatározása (primer extension)

A reakcióhoz tervezett primer (lacZprex) 5' végét $[\gamma - {}^{32}P]$ ATP-vel jelöltük T4 polinukleotid kinázzal (Gibco). A reakciót 20 µl térfogatban végeztük, ami tartalmazott 50 µg, totál RNS-t, 2 pmol radioizotóppal jelölt DNS primert, mind a négy nokleotidból 2 mM-t, 2 M betaint, 1 mM MnCl₂-ot, 10 mM Tris-HCl-t (pH 8,3), 90 mM KCl-ot és 5 egység *Tth* DNS polimerázt (Promega). A reakcióelegyet 74°C-on 30 percig tartó inkubálás után etanollal kicsaptuk, majd RN-ázzal emésztettük 37°C-on 30 percig. A terméket 6%-os denaturáló (8 M urea) poliakrilamid gélen (38:2 akrilamid-biszakrilamid) választottuk el.

Az autoradiogrammot Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.) készüléken vizualizáltuk.

3.17. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakciót DNS szakaszok amplifikálására használtuk. A fehérje termeltetéshez előállított rekombináns plazmidokba épített inszertek amplifikációját *Pfu* (Promega) polimerázzal végeztük. Nagyobb méretű DNS darabok amplifikálásánál *KlenTaq* (Sigma), más esetekben *Taq* (Promega, Fermentas) polimerázokat használtuk. Az enzimek használatakor a gyártó utasításait követtük. Általában a reakciókat 50 µl végtérfogatban, 50-50 pmol primer, 2,5 mM MgCl₂, 2µl 2,5 mM dNTP oldat, 2-5 U polimeráz és 5 µl 10X polimeráz puffer jelenlétében végeztük.

3.18. β–Galaktozidáz aktivitás mérés

Az *E. coli, R. meliloti* és az *A. tumefaciens* törzsekben végzett β -galaktozidáz aktivitásának meghatározása Miller és munkatársai által kidolgozott módszerrel történt (Miller, 1972).

3.18.1. Represszió értékek (R) meghatározása

A repressziót az alábbi egyenlet alapján számítottuk: MU= Miller Unit

MU, indukált, fehérjét termelő R= 1 - MU, indukálatlan, fehérjét nem termelő

3.19. Fehérje túltermeltetés

Az expressziós vektorba (pET16, pET22, Novagene) épített DNS fragmentek által kódolt fehérjék túltermeltetésére *E. coli* BL21(DE3)pLys3 törzset használtuk. A transzformálás során keletkezett telepek éjszakán át szaporított tenyészeteit 100x-ra higítottuk, és OD₆₀₀ 0,6-0,8 értékig (kései log fázis) növesztettük. Az expresszió indukciójához IPTG-t alkalmaztunk (0,5 mM IPTG) 2-3 órán keresztül 37 °C-os inkubációval.

3.20. Fág DNS tisztítás

A bakteriofág DNS tisztítását Dallmann és munkatársai (1979) által leírtak szerint végeztük.

3.21. Fehérjék elválasztása

A fehérjék elválasztását Laemmli által leírt SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük (Laemmli, 1970). A gélt és a puffereket Sambrook és mtsai által leírtak alapján készítettük. A gélben a fehérjéket *Coomassie brillant blue* festékkel festettük meg, majd a felesleges festéket 10% ecetsavat és 20% metanolt tartalmazó eleggyel mostuk ki. A glutáraldehid keresztkötés során a tisztított PemI és PemK_(His) fehérjéket az EMSA kísérletekben használt összetételű pufferben 1% végkoncentrációjú glutáraldehiddel inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten és utána a fentieknek megfelelően végeztük az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist.

3.22. His-Tag jelölt fehérjék izolálása, tisztítása

A His-Tag jelölt fehérjéket QIAGEN QIAexpress kittel tisztítottuk, a gyártó utasításait követve.

3.23. Gél-retardációs teszt ("band-shift")

A hidroxil gyök interferencia footprint reakciókhoz szükséges EMSA kísérleteket Bodogai és mtsai. által leírtak alapján végeztük (Bodogai és mtsai., 2006).

3.24. DN-áz I footprint

A DN-áz I protekciós footprint kísérleteket Bodogai és mtsai. által leírtak alapján végeztük (Bodogai és mtsai., 2006). Az autoradiogrammokat Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.) készüléken vizualizáltuk.

3.25. Hidroxil gyök footprint

A hidroxil gyök interferencia footprint vizsgálatokat Papp és munkatársai által leírtak alapján hajtottuk végre (Papp és mtsai., 2000). Az autoradiogrammokat Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.) készüléken vizualizáltuk.

3.26. Bioinformatikai módszerek és internet oldalak

A vizsgált organizmusok ortológ génjeit az NCBI mikrobiális BLAST programjával azonosítottuk (Pearson és Lipman, 1988). A génsebészeti manipulációkhoz szükséges nukleotid bázissorrend információkat is innen merítettük.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.27. Vegyszerek és enzimek

A felhasznált finomvegyszerek a Reanal, Serva és a Sigma cégektől származtak. A restrikciós endonukleázokat a Promega, az MBI Fermentas és az Amersham cégektől vásároltuk. A *Pfu*, a *Taq* polimeráz és *Klenow* polimeráz enzimeket a Promega, míg a *KlenTaq* polimerázt a Sigma cégtől szereztük be. A T4 DNS ligázt az MBI Fermentas cégtől vásároltuk. A radioizotóppal jelölt nukleotidokat az Izotóp Intézet Kft. szállította.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Bevezetés

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

Kísérleteink során egyrészről az általunk létrehozott egy kópiás *in vivo* riporter rendszerekkel vizsgáltuk a *16-3* fág eredetű vad és aminosavcserét tartalmazó mutáns C represszor fehérjéknek a kölcsönhatását vad és mutáns operátoraikkal. Célunk ezzel egy olyan szupressziós fenotípust, megváltozott specificitást, adó mutáns represszor izolálása, mely a DNS-fehérje komplex kialakulásának pontosabb megértéséhez közelebb vihet minket. Ezekkel a kísérletekkel a represszor és operátorainak dokkolási mintázatát vizsgálhatjuk, vagyis hogy a két vad operátoron (O_{R2} és O_{L2}) a dokkolási felület használatában létezik-e eltérés.

Másrészről *A. tumefaciens*ből izolált *pemIK* ortológ toxin-antitoxin (TA) rendszer operonjának finom molekuláris architektúráját és funkcióját tanulmányoztuk. Vizsgáltuk promóter régióját, azonosítottuk operátorát és regulációs viszonyait. A fehérjék inerakciójának vizsgálatát célzó kísérleteket kiegészítettük fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására alkalmas keresztkötési eljárásokkal is.

4.2. Egy kópiás in vivo mérőegység előállítása

Számos genetikai tanulmány és biotechnológiai manipuláció igényli, hogy a gazdasejtben végezzenek kísérleteket a vizsgálni kívánt szabályozó fehérjékkel és operátoraikkal. A különböző fajok eltérő anyagcserével, belső miliővel (pH, ionerősség stb.) rendelkeznek, mely nem minden esetben teszi lehetővé a pontos tanulmányozást, kizárja például a gazdafaktorok hatásait, egy másik fajban vizsgálva.

Amennyiben a legprecízebb összehasonlításokat szeretnénk elvégezni, törekednünk kell a vizsgált operátor–riportergén kópiaszámának stabilitására. Ha az operátor–riportergén episzómán van jelen, akkor nem állandó a kópiaszáma, hiszen ez változhat bizonyos anyagcserefolyamatok, antibiotikomok, sejtet ért stressz hatására. Ezért szükség van egy stabil, lehetőleg kromoszómára integrált, egy kópiás mérőrendszerre. Ezen kívül ez a felállás modellezi leginkább a profág stádiumot, ami a bakteriofág represszorok és operátoraik vizsgálata során igencsak előnyös helyzet.

Még szerencsésebb a helyzetünk, ha a mérőegység integrációja nem befolyásolja a sejt életfolyamatait.

Munkánk során a *R. meliloti* 41 *16-3* fágjának *c* represszor génje által kódolt C represszor fehérje és operátorainak kölcsönhatását tanulmányoztuk. A gazdasejtben történő *in vivo* vizsgálatokhoz ezért előállítottunk egy a *16-3* fág helyspecifikus rekombinációs rendszerét is hordozó integratív plazmid vektort.

A vektor építése során a pSEM143 plazmidba (Semsey és mtsai., 2002) beépítettük a 16-3 fág funkcionális attP régióját tartalmazó 261 bp hosszú DNS fragmentet. Az így kapott pSEM155 plazmidba (Semsey és mtsai., 2002) a pSEM164 plazmid (Semsey és mtsai., 1999) 16-3 fág helyspecifikus integrációját katalizáló integrázt termelő egységét építettük. Az így kapott pSEM289 plazmid kanamicin rezisztenciát kódoló PvuII fragmentet deletáltuk és helyére beépítettük a pCU996Ω (Banerjee és mtsai., 1996) spektinomicin rezisztenciát kódoló inszertet, majd a plazmid Acc65I feltöltött helyére beépítettük a pMLB1109 plazmid (Papp és mtsai., 1993) 4,2 kbp hosszú DraI fragmentjét, mely tartalmaz egy promoter nélküli lacZ gént T₁T₂ terminátorokkal határolva 5'irányból. Az így kapott pGSB1 plazmidba KpnI/Acc65I restrikciós helyre lehet inszertálni a vizsgálni kívánt operátor-promóter régiót tartalmazó DNS darabot (11. ábra). A pGSB1 plazmid pSC101 replikont tartalmaz, mely csak E. coliban biztosítja a replikációt, míg R. melilotiban, és a vele rokonságot mutató számos baktériumfajban, nem. A vektor mob régiója pCU1 eredetű, ami biztosítja pCU101 konjugációs helper plazmid segítségével a vektor mobilizálását konjugációval E.coliból R. melilotiba. Az attP régió és a tac promoter által meghajtott 16-3 int gén lehetővé teszi a célzott helyspecifikus integrációját a plazmidnak az *R.meliloti* 41 genoforjába a *cys46* és *met5* gének között, az attB régiónál, a bakteriális gének funkcióvesztése nélkül (Blaha és mtsai, 2004). A lacZ gén hatékony riportergén és az upstream található T₁T₂ terminátorok gátolják a nemkívánatos, zavaró transzkripciót 5'irányból. A spektinomicin rezisztenciát biztosító gén (Sp^r) nagyon jól működő szelekciós marker minden általunk vizsgálni kívánt baktériumfajban.



11. ábra.: pGSB1 vektor térképe az egyedi restrikciós helyek feltüntetésvel.

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

Sajnálatos módon *R. meliloti*ban nem áll rendelkezésre az *E. coli*ban megszokott promóterek széles tárháza, ezért kénytelenek voltunk egy hatékony, de nem túl magas alapaktivitást mutató *R.meliloti*ban is használható promóter kiválasztására. E célból terveztünk olyan σ^{70} típusú promóterhez hasonló oligonukleotidokat, melyek tartalmaztak egy 14 bp hosszú O_{R2} represszor kötőhelyet a -10 és -35 promóter elemek közé ékelődve, megtartva az ideális 15 bp távolságot a két fontos promóter box között (12A ábra). A -10 régióban az N jelölés bármelyik nukleotid lehet. Azért, hogy *R. meliloti*ban kiválogathassuk a megfelelő promótereket a pSEM91 plazmid (Semsey és mtsai., 1999) *Acc*65I restrikciós helyét, ragadós véget vágó restrikciós endonukleáz, emésztés után Klenow polimeráz segítségével feltöltöttük és a pMLB1109 plazmid (Papp és mtsai., 1993) 4,2 kbp hosszú *Dra*I fragmentjét beépítettük. Az így kapott pSEM211 konjugatív mérőplazmid képes replikálódni *R. meliloti*ban is, ellentétben az integratív, nem replikatív pGSB1 plazmiddal, melynek visszanyerése *R. meliloti*ból nagyon körülményes.

Szintetikus degenerált oligonukleotidok felhasználásával a pSEM211 *Acc*65I, a fent leírt módon tompa véget generálva, restrikciós helyre építettük a promoter-operátor egységet, majd *E. coli*ba transzformációval bejuttatott plazmidokat konjugációval *R. meliloti*ba juttattuk. A kék színű, magas béta-galaktozidáz aktivitású, kolóniákból plazmidot izoláltunk és nukleotidsorrend meghatározást végeztünk. Az eredmények alapján a TATAGT nukleotidokat tartalmazó -10-es boxot tartalmazó promótert használtuk a fág C represszor és operátorainak kölcsönhatása vizsgálata során (12B ábra).

-35 -10 5'-TTGACT<u>ACAATTGTAG**TTGT**</u>AT*N*TA*N*T-3' O_{R2} operátor

-35

Α

В

-10

5'-TTGACT<u>ACAATTGTAGTTGT</u>ATATAGT-3'

O_{R2} operátor

12. ábra: *R. meliloti*ban használható promóter előállítása. (**A**) Degenerált -10 régióval és 14 bp hosszú O_{R2} kötőhellyel felruházott szintetikus promoter. (**B**) Általunk szelektált, a későbbiekben a *R. meliloti*ban használt szintetikus promóter.

A szelekció után kiválasztott promóter környezetbe szintetikus oligonukleotidok felhasználásával építettük a pGSB1 Klenow polimerázzal feltöltött *Acc*65I helyére az O_{L2} operátort és az O_{R2} kötőhelyeit tartalmazó szintetikus promóter-operátor egységeket

(OL2 5'-TTGACTCTACAATTGATTGATTGATATAGT -3' tartalmazza a pGSB42 és

O_{R2} 5'-TTGACT<u>ACAA</u>TTGTAG<u>TTGT</u>ATATAGT -3' tartalmazza a pGSB62 plazmid)

A pGSB42 és pGSB62 integratív, *R. meliloti*ban nem replikálódó, mérőplazmidokat konjugációval stabilan beépítettuk a *R. meliloti* 41 és az *A. tumefaciens* C58 kromoszómájába. Az *A. tumefaciens* esetében is ugyanaz a konzervált prolin-tRNS-t kódoló genom rész szolgál integrációs célul, mint a *R. meliloti*nál. A plazmidjaink mindkét fajban egyaránt stabil helyspecifikus integrációra képesek (Semsey és mtsai., 2002). Az *A. tumefaciens* C58 azért is érdekes számunkra, mert széles körben használatos organizmus a biotechnológiában és közeli rokona a *R. meliloti*nak, ezért jó kontroll organizmusként szolgál.

Ezt követően a vad típusú *16-3 c* gént hordozó (pSEM91-ből előállított) pPM232 (Papp és mtsai., 2002) *R. meliloti*ban és *A. tumefaciens*ben is replikatív plazmidot, illetve a kontrollként használt represszort nem tartalmazó pSEM91 plazmidokat konjugációval átjuttattuk a vizsgált baktérium fajokba. A represszort így transz helyzetből plazmidról tudtuk, nagy moláris túlsúlyban, termeltetni és a *lacZ* riportergénen keresztül mértük a represszió értékeket a két vad típusú operátoron (O_{L2} és O_{R2}). A kapott eredményeket a 13. ábra mutatja.

Represszor			-	Vad típus		
Operátor		R. meliloti	A. tumefaciens	R. meliloti	A. tumefaciens	
O_{L2}	MU	46 ± 1	220 ± 5	10 ± 0	45 ± 1	
	R	-	-	<u>0.78</u>	<u>0.80</u>	
O _{R2}	MU	60 ± 3	241 ± 2	11 ± 1	40 ± 1	
	R	-	-	<u>0.81</u>	<u>0.83</u>	

13. ábra. Vad típusú represszor hatásának vizsgálata két vad típusú *16-3* fág operátoron *R.meliloti* és *A. tumefaciens* esetében. MU= Miller Unit, R= represszió mértéke

A mérések alapján megállapíthatjuk, hogy a két vizsgált vad típusú operátor (O_{L2} és O_{R2}) a genoforra célzottan bejuttatva, a vad C represszort transz helyzetből termeltetve mindkét fajban szinte azonos represszió értékeket adott. Az eredmények alapján, tehát a konstruált mérőegység alkalmas a *16-3* bakteriofág C represszorának és operátorainak tanulmányozására a gazdaszervezetben.

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

A 263 aminosavból felépülő C represszor fehérje felismerő hélix része a homológiák alapján jól prediktálható. A más helix-turn-helix típusú DNS kötő fehérjékhez hasonlóan a DNS kötő motívum egy különálló, a *16-3* C represszor esetében is kilenc aminosavból felépülő hélixet képez (14. ábra). A hélix aminosavainak oldalláncai nem mind egyenértékűek a felismerés, dokkolás és kötés tekintetében. A hasonló represszor fehérjék esetében a hélix első, második, ötödik illetve hatodik aminosavainak oldalláncai a legbefolyásosabbak az operátor felismerésben.

MHKGTFHMSRLTDTLAAKLEEAGITQAELARRVGQS**QQAINNLFA**GRAASSMVWRELAR ELGIDEQEMRQMMTEAGRDPEKVTSLAGLRKYRAVLPSPREPFPIIRQQEHLPRPNATIGEE TNMEPRKKKLLPVLGEAVGGEDGEYIFNGSVLDYVDCPPSLENVPNAYAVYIDGESMVPR FRPGETVWVHPTKPPRRGDDVVIQIHPDNEDDGAPPRGFVKEFVGWTANKLVLQQYNPTK KIEFTREQVVSVHPIILAGKYW

14. ábra.: *16-3* bakteriofág C represszorának aminosavsorrendje. Kiemelt aminosavak alkothatják nagy valószínűséggel a DNS nagy árkába fekvő, az ott lévő bázisokkal specifikus kapcsolatot kialakító felismerő vagy 2. hélixet.

Azért, hogy meghatározzuk a felismerő hélix egyes aminosavainak részvételét az operátor felismerésében, kötésében, előállítottunk egy olyan kísérleti rendszert, mely alkalmas

aminosavcserék generálására az általunk vizsgálni kívánt felismerő hélixet is tartalmazó represszor régióban. A fág genomról oligonukleotid primerek felhasználásával PCR-el izolált C represszor fehérjét kódoló ORF részt tartalmazó pPM232 plazmidot *XbaI-EagI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük, deletálva a represszort kódoló régió egy részét. Ezt követően XbaIrep5 és CM-E low oligónukleotid primerekkel a deletált rész az intakt pPM232 plazmid DNS templátról amplifikáltuk és beépítettük a pPM232 plazmid *XbaI-EagI* restrikciós endonukleázokkal linearizált vektorba. Így szintetikus oligonukleotid primerek felhasználásával egy olyan, a két hélixet elválasztó turn részre eső, *MscI* hasítóhelyet tartalmazó represszort kódoló plazmidot hoztunk létre, melynek a transzláció során az aminosav sorrendje identikus a vad represszoréval. Az így kapott pPM238 plazmid *MscI-EagI* restrikciós helyei közé szintetikus oligonukleitidokat építhetünk, melyek aminosavak kicserélését teszik lehetővé frame shift és más mutáció kizárása mellett (15. és 16. ábrák).



15. ábra: pPM238 plazmid térképe, feltüntetve a hélix cserét lehetővé tevő régiót és restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit.

tggC CAA AGC CAA CAG GCG ATC AAC AAC CTA TTT GCC ggccg

MscI Gln Gln Ala Ile Asn Asn Leu Phe Ala EagI Q37 Q38 I40 N41 N42 L43

16. ábra.: C represszor fehérje felismerő hélixének cseréjére alkalmas DNS szakasz és a mutáltatott aminosavak.

Annak eldöntésére, hogy az adott pozícióban jelen levő aminosavak oldalláncai az operátoron történő dokkolásban és kötésben szerepet játszanak-e, nagyon rövid oldalláccal rendelkező alaninra

cseréltük le a Q37, Q38, I40, N41, N42 és I43 aminosavakat az Ala1, Ala2, Ala4, Ala5, Ala6 és Ala7 oligonukleotid párok beépítésével a pPM238 plazmid *MscI- EagI* restrikciós helyei közé, a 39. pozícióban a vad típusú represszor is alanint tartalmaz. Az alanin scanning tervezésénél Ebright előírásait tartottuk szem előtt (Ebright, 1991). A nukleotidsorrend ellenőrzését követően a vad és alanin mutáns represszorokat kódoló vektorokat, valamint a represszort nem kódoló, negatív kontrollként szolgáló, pSEM91 plazmidot a két vad típusú operátort tartalmazó (pGSB42 és pGSB62 integratív plazmidokat már a kromoszómán hordozó) *R. meliloti* 41 törzsébe juttattuk konjugációval. A *lacZ* riportergénen keresztül meghatároztuk a represszió mértékét az O_{L2} és O_{R2} operátorokon az alanin cserés represszoroknak. A kapott eredményeket a 17. ábra mutatja.

Represszor Operátor	C ^{wt}	C ^{ME}	C ^{Q37A}	C ^{Q38A}	C ^{I40A}	C ^{N41A}	C ^{N42A}	C ^{L43A}
O _{L2}	0,80	0,76	0,12	0,30	0,31	0,21	0,34	0,37
O _{R2}	0,81	0,79	0,13	0,24	0,25	0,23	0,43	0,39

17. ábra: Vad és alanin cserés mutáns represszorok R értékeinek eredménye vad operátorokon (O_{L2} és O_{R2}). C^{ME} a vad represszorral azonos aminosavsorrenddel rendelkező, aminosavcserét lehetővé tevő konstrukció. SD < 5%

A mérések alapján elmondhatjuk, hogy a pPM232 plazmidról átíródó vad represszor hatékonysága a vad operátorokon megegyezik a pPM238 vektorról hajtott *MscI- EagI* cserélhető panelt tartalmazó vad represszorral identikus aminosavsorrenddel rendelkező represszorral, tehát az új restrikciós hely kialakításával járó nukleotidcserék nem befolyásolták a transzlációt és a funkciót. A kísérleti rendszer tehát alkalmas a represszor mutációk vizsgálatára. A legnagyobb funkciókiesést a C^{Q37} pozíció, a legkisebb hatású mutációt pedig a C^{L43} minosavak alanin cseréje okozta. A két operátor viselkedése nem mutatott jelentős eltérést az alanin csere hatására.

4.2.3. Operátor mutánsok előállítása

A két eltérő hosszúságú vad operátor és a C represszor fehérje kölcsönhatása kapcsán felmerül az az alapvető kérdés, hogy a DNS-fehérje komplex kialakulása során azonos vagy eltérő a dokkolási felszín, vagyis a két eltérő hosszúságú operátor esetében ugyanazon atomcsoportok között jön-e létre a kötés vagy eltérő oldallánc és bázis kapcsolatok vesznek részt a komplex kialakulása során. Ennek eldöntésére egy megváltozott specificitású, lényegében szupresszor fenotípust adó, mutáns C

represszort célszerű izolálni. Az ilyen mutáns fehérje viselkedésének vizsgálata a két vad operátoron egyértelműen eldönti a kérdést.

Megváltozott specifitású represszor izolálásához szükséges olyan mutáns operátorok előállítása, melyen a vad represszor alcsony R értéket ad (funkcióvesztés) viszont a mutáns represszor a vad típusú represszornak vad operátorhoz közeli represszióval, funkcióval, rendelkezik.

Ha a represszorok in vivo riportergén felhasználásával mért R értékeit összehasonlítjuk a fágon adott funkcionális tulajdonságaival, vagyis hogy milyen represszió értéktől mondhatjuk a vad típusú, lizogén fenotípust adó, represszorról, hogy a fágon is hatékonyan működne, nagyon jó támpont lehet a virulens, immunitás inszenzitív természetes O_r^c -1 *16-3* mutáns. Ez a fág egy aszimmetrikus A-<u>*G*</u> nukleotidcserét hordoz (AC<u>*G*</u>AttgtagTTGT) az O_{R2} operátor egyik félkötőhelyén, az O_{R1} megegyező a vad típuséval. Az *in vivo*, *lacZ* riportergénen keresztül mért eredmények szerint a mutációt hordozó operátor a vad típusú repressziójának csak 69 %-át (R=0,54) mutatja a vad represszor jelenlétében mérve. Ez a 0,54 R érték jelzi, hogy ekkora represszió érték nem elég a lizogén fenotípus kialakításához az 'in phage'szituációban (Papp és mtsai, 2002).

A továbbiakban a pGSB1 plazmidba szintetikus oligonukleotidok felhasználásával olyan mutáns operátorokat építettünk, melyek szimmetrikus mutációkat hordoztak minden pozícióban, ami a kötés szempontjából fontos (18. ábra). Promóterként a 12. ábrán látható nukleotidkörnyezet szolgált az O_{R2} operátor mutánsaihoz.

A .: O_{R2} operátor mutánsok elnevezési topológiája

A C A A ttgtag T T G T 1, 2, 3, 4 -4,-3,-2,-1

B.: Operátorba épített szimmetrikus mutációk nukleotidsorrendje

O _{R2} ¹⁻¹	O_{R2}^{2-2}	O_{R2}^{3-3}	O_{R2}^{4-4}
<u>GCAA</u> TTGTAG <u>TTGC</u>	<u>AGAA</u> TTGTAG <u>TTCT</u>	<u>ACGA</u> TTGTAG <u>TCGT</u>	<u>ACAG</u> TTGTAG <u>CTGT</u>
<u>CCAA</u> TTGTAG <u>TTGG</u>	<u>AAAA</u> TTGTAG <u>TTIT</u>	<u>ACCA</u> TTGTAG <u>TGGT</u>	<u>ACAC</u> TTGTAG <u>GTGT</u>
<u>TCAA</u> TTGTAG <u>TTGA</u>	<u>ATAA</u> TTGTAG <u>TTAT</u>	<u>ACTA</u> TTGTAG <u>TAGT</u>	<u>ACAT</u> TTGTAG <u>ATGT</u>

18. ábra: O_{R2} típusú operátorok szimmetrikus mutációinak elrendezése (A) és nukleotidsorrendjeik (B).

Az operátor mutációkat hordozó vektorokat integráltattuk *R. melilotiba* és meghatároztuk a represszió értékeket a vad represszorral szemben. A mért adatokat a 2. táblázat mutatja.

	-		1		1		
operátor	R	operátor	R	operátor	R	operátor	R
$O_{R2}^{1-1/gc}$	0,32	$O_{R2}^{2\text{-}2/gc}$	0,39	$O_{R2}^{3-3/gc}$	0,73	$O_{R2}^{4-4/gc}$	0,45
${O_{R2}}^{1\text{-}1/cg}$	0,50	$O_{R2}^{2-2/ta}$	0,37	$O_{R2}^{3-3/cg}$	0,42	$O_{R2}^{4-4/cg}$	0,66
$O_{R2}^{1-1/ta}$	0,60	$O_{R2}^{2-2/at}$	0,31	$O_{R2}^{3-3/ta}$	0,58	$O_{R2}^{4-4/ta}$	0,53
$O_{R2}^{\ wt}$	0,81						

2. táblázat.: Mutáns O_{R2} típusú operátorok represszió értékei vad represszorral mérve. SD < 5%

A szimmetrikus mutációt tartalmazó operátorokon vad represszorral kapott mérési eredményekből láthatjuk, hogy a leginkább lecsökkent R értékeket, legjelentősebb funkcióvesztés, a 2-2 mutáns operátorok és az 1-1 mutánsok csoportjaiból kerültek ki.

4.2.4. Megváltozott specificitású represszor vizsgálata vad és mutáns O_{R2} operátorokon

A fenti erdményekből kiindulva a legnagyobb funkciókiesést mutató 2-2 mutáns és az 1-1 mutáns operátorokkal nagy valószínűséggel kapcsolatot kialakító Q37 és Q38 aminosavak mutagenezise lehetőséget adhat megváltozott specificitású represszor izolálására.

A represszor fehérje aminosavcseréit a pPM238 plazmid *MscI- EagI* restrikciós hasítóhelyei közé épített, pozícionálisan degenerált szintetikus oligonukleotidok beépítésével végeztük. A kapott mutáns represszorokat nukleotidsorrend meghatározással ellenőriztük. Az előállított aminosavcseréket az 19. ábra jelöli.

A.

 NNN

 tggC CAA AGC CAA CAG GCG ATC AAC AAC CTA TTT GCC ggccg

 NNN

 MscI
 Gln Gln Ala Ile Asn Asn Leu Phe Ala EagI

 Q37 Q38
 I40
 N41
 N42
 L43

В.

 $Q37 \rightarrow Ala, Arg, Leu, Ile, His,$

 $Q38 \rightarrow Ala, Arg, Met, Glu, Val$

19. ábra.: Aminosav mutációk készítése, részlegesen degenerált (NNN) szintetikus oligonukleotidok felhasználásával (A). A 2. hélix Q37 és Q38 pozícióinak mutagenezise során izolált aminosavcserék az adott régióban (B). Az alanin cserék már rendelkezésre álltak a korábbi kísérletekből.

A mutáns operátor-promóter egységeket integráltattuk *R. meliloti* 41 genoforba és konjugációval bejuttattuk az aminosavcserés represszorokat, majd a riportergénen keresztül meghatároztuk a represszióra gyakorolt hatásukat. A mérési eredményeket a 3. táblázat foglalja össze

3. táblázat.: Operátor mutánsok és represszor mutánsok egymáson mért represszió értékeinek összefoglaló táblázata. O_{R2}^{1-1} operátor mutánsokon kapott értékek C^{Q37} mutáns represszorokkal mérve (**A**). O_{R2}^{2-2} operátor mutánsokon kapott repressziók adatai C^{Q38} mutáns represszorokkal mérve (**B**). SD < 5%

A.

O_{R2}^{1-1}	$O_{R2}^{1-1/gc}$ (R)	$O_{R2}^{1-1/cg}(R)$	$O_{R2}^{1-1/ta}$ (R)	$\mathbf{O}_{\mathbf{R2}}\left(\mathbf{R}\right)$
C ^{wt} (pPM232)	0,32	0,52	0,60	<u>0,82</u>
C ^{ME} (pPM238)	0,28	0,53	0,61	0,80
C ^{Q37Arg}	0,12	0,08	0,1	0,29
C ^{Q37Leu}	0,18	0,16	0,18	0,28
C ^{Q37Ile}	0,31	0,07	0,13	0,23
C ^{Q37His}	0,26	0,24	0,18	0,20
C ^{Q37Ala}	0,34	<u>0,90</u>	0,38	<u>0,11</u>

В.

O_{R2}^{2-2}	$O_{R2}^{2-2/gc}$ (R)	$O_{R2}^{2-2/at}$ (R)	$O_{R2}^{2-2/ta}$ (R)	$\mathbf{O}_{\mathbf{R2}}$ (R)
C ^{wt} (pPM232)	0,40	0,31	0,37	0,80
C ^{ME} (pPM238)	0,36	0,31	0,36	0,80
C ^{Q38Arg}	0,23	0,075	0,13	0,07
C ^{Q38Met}	0,13	0,07	0,13	0,15
C ^{Q38Glu}	0,20	0,15	0,19	0,22
C ^{Q38Val}	0,21	0,32	0,25	0,28
C ^{Q38Ala}	0,16	0,21	0,18	0,25

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy sikeresen izoláltunk egy megváltozott specificitású C^{Q37Ala} represszort, mely képes volt a vad represszorral szemben funkcióvesztett $O_{R2}^{1-1/cg}$ mutációt igen nagy hatékonysággal szupresszálni.

4.2.5. Megváltozott specifitású mutáns represszor viselkedése OL2 típusú operátoron

Az O_{L2} és O_{R2} operátorok félkötő régiói az eltérő 4 illetve 6 nukleotid szeparáció miatt más térbeli elrendeződést mutatnak. Ennek ellenére funkcionálisan megegyeznek és a mért repressziók értéke a két operátor típuson gyakorlatilag ugyanaz a vad represszorral vizsgálva. Ha a represszor–DNS kölcsönhatás során azonos aminosav oldalláncok és nukleotidok vesznek részt, akkor a rövidebb operátor $O_{R2}^{1-1/Cg}$ operátorral megeggyező mutációját is képes szupresszálni a megváltozott specificitású alanin cserés represszor.

Ennek megvizsgálására létrehoztunk egy olyan pGSB42 alapú konstrukciót szintetikus oligonukleotid primerek felhasználásával, mely az O_{1,2} típusú operátoron is alkalmas a megváltozott specificitású represszor vizsgálatára. А vad O_{L2} operátort (TTGACTCTACAATTGATTGTATATAGT) és az $O_{R2}^{1-1/Cg}$ azonos mutációját hordozó O_{L2} $O_{L2}^{1-1/cg}$ operátorra jellemző nukleotidsorrenddel rendelkező mutáns operátort (TTGACTCT<u>CCAA</u>TTGA<u>TTGG</u>ATATAGT) integráltattuk R. melilotiba és konjugációval a vad és szupresszor represszorokat tartalmazó vektorokkal meghatároztuk a kölcsönhatásaikat. A mérések eredményeit a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat: Megváltozott specificitású represszor (C^{Q37Ala}) vizsgálata mutáns $O_{R2}^{1-1/cg}$ és $O_{L2}^{1-1/cg}$ operátorokon.

Operátor	C ^{wt} (pPM232) R	C ^{Q37Ala} R
O _{R2}	0.81	0,13
$O_{R2}^{1-1/cg}$	0,50	0,89
O _{L2}	0,80	0,12
$O_{L2}^{1-1/cg}$	0,24	0,29

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

4.3. A. tumefaciens addikciós modul jellemzése

4.3.1. pemIK homológ TA modul izolálása

A növénypatogén baktériumok közül az *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) genetikája és fiziológiája a legismertebb, genomjának nuleotidsorrendje meghatározott (Goodner és mtsai., 2001). Semmi nem ismert még azonban az addikciós moduljairól, melyek azonosítása kiszélesítheti a már amúgy is széles körben használt organizmus felhasználási lehetőségeit a biotechnológiában és a gazda-patogén interakciók tanulmányozásában, továbbá új védekezési lehetőségeket, antibiotikumokat, fejleszthetünk ki a növényvédelem, növénytermesztés számára.

Az addikciós modulok közül az *A. tumefaciens* genoforon predikció alapján egy *mazEF/pemIK* családba sorolható putatív TA modult találtunk az adatbázisban. Az itt található információk szerint két egymással részlegesen átfedő (egy nukleotid) ORF alkotja az operont. Az egyik fehérje, a PemI feltételezett antitoxin, 267 nukleotid hosszú (M4) és a róla képződő transzkriptum 88 aminosavnyi rövid protein. A PemK homológ feltételezett toxin fehérje 119 aminosavból áll és 360 nukleotidos az ORF-je (M5), mely downstream lokalizálódik az inhibítort (pemI) kódoló ORF-hez képest.(20. ábra). Az *A. tumefaciens* pemI és pemK aminosav szinten 38% illetve 37% homológiát mutatnak az *E. coli* ortológokhoz. A génszbályozás és a TA modul működését leíró modell elkészítéséhez nélkülözhetetlen a promóter régió, operátor azonosítása továbbá a két fehérje egymással történő interakciójának meghatározása. Kísérleteinket ezen célok alapján terveztük.



20. ábra: *A. tumefaciens pemI* és *pemK* cisztronok strukturális elrendeződése. Szürkével jelölt rész az átfedést jelöli a két ORF között, a nyilak a promóter azonosítása során használt oligonukleotid primereket jelzik. A ? a még azonosítatlan régiókat jelöli. A pontos nukleotidsorrendek megtalálhatók a Mellékletben (M4, M5).

4.3.2. Promóter régió és transzkripciós starthely azonosítása

Első lépésként azt kellett eldönteni, hogy az adott operonban van -e aktív transzkripció és ha igen, akkor hány promóter található az ORF-ek előtt, esetleg létezik-e belső promóter. Az E.coli estében a pemI-t 5' irányból határoló régiójában van a szabályozó egység egy promóterrel, a pemK itt nem tartalmaz belső promótert (Masuda és mtsai., 1993). A szabályozó régió azonosításához felhasználható a pGSB1 plazmid, hiszen ez hatékonyan tud integrálódni az A. tumefaciens kromoszómára, amivel a genofor környezet nagyon jól utánozható a transzkripció vizsgálata során. A pemPR up és pemPR low, az ORF1 előtt 5' irányban található, illetve a pemPR up és pemPRK low primerekkel, az ORF2 előtt 5' irányban esetlegesen létező belső promótert is kimutatva, PCR amplifikációt végeztünk (20. ábra) A. tumefaciens totál DNS templátról Pfu polimerázzal. A 133 bp és 455 bp hosszú amplikonokat a pGSB1 Acc65I Klenow fragmenttel feltöltött helvére építettük és nukleotidsorrend meghatározással ellenőriztük. A kísérlet tervezésénél figyelembe vettük, hogy olyan és akkora régiót válasszunk az irodalmi adatokból kiindulva, mely nagy valószínűséggel tartalmazhat szabályozó elemeket. Az így kapott promóter-lacZ fúziós egységet tartalmazó pAPR1 és pAPR11 plazmidokat integráltattuk az A. tumefaciens genoforba, majd OD 600 =0,6 értékig növesztettük és totál RNS-t izoláltunk. Ezt követően Tth polimeráz felhasználásával végzett primer extenzióval meghatároztuk a transzkripciós starthelyet (21. ábra). Primerként a reakció specificitásának növelésére az E.coli eredetű lacZ génhez komplementer oligonukleotidot használtuk (lacZprex).



21. ábra: *A. tumefaciens pemIK* operon transzkripciós starthelyének meghatározása primer extenzióval. TGCA a referenciaként használt nukleotidsorrend meghatározás megfelelő bázisait jelölik. +1: transzlációs starthely, -18 és -22 : transzkripciós starthelyek a transzlációs starthoz viszonyítva

A kapott eredmények szerint három lehetséges startpontról indulhat a transzkripció, melyek közül a legerőteljesebb a *pemI* cisztron transzlációs startponttól -22 nukleotidnyira található citozin. A *pemK* régiótól 5' irányban nem találtunk belső promótert. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a két fehérje transzkripcióját a pemI cisztront 5' irányban megelőző promóter egység végzi.

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

Miután megbizonyosodtunk az általunk vizsgált DNS fragmentumról induló aktív transzkripcióról, a putatív addikciós modul működőképességét vizsgáltuk. Ezek során olyan kísérleti rendszereket alakítottunk ki, melyek alkalmasak a TA modulok fehérje szintű kapcsolatainak kimutatására, továbbá a lehetséges operátorokkal kialakított interakciók vizsgálatára.

A. tumefaciens esetében nem áll rendelkezésre rekombinációban deficiens törzs, sem megbízható, induktív expressziós rendszer, mely nagyon fontos egy a sejt anyagcseréjére esetleg toxikus, gátló hatású fehérje vizsgálata során. Ezen kívül nem ismeretes, hogy milyen más faktorok szabályozzák a TA modulok működését ebben a fajban. Ezeknek a nem kívánt hatásoknak az elkerülése miatt, hogy "tiszta" kísérleti modellünk legyen, heterológ expressziós rendszert alkalmaztunk. A pemIK ORF-eket IbadNco és pemKlowBam oligonukleotid primerekkel, a PemI fehérjét kódoló DNS fragmentet IbadNco és pemKlowBam oligonukleotidokkal és a toxin, PemK, kódolásáért felelős régiót KbadNco és pemKlowBam primerek segítségével PCR-el amplifikáltuk és izoláltuk (22. ábra).



22. ábra: *A. tumefaciens* TA modul ORF1 és ORF2 izolálása során használt oligonukleotid primerek (\rightarrow) helyzete az operon mentén.

A PCR termékeket *NcoI-Bam*HI emésztés után a nagy repressziós hatékonyságú arabinóz operont tartalmazó expressziós vektorként széles körben használt, pBAD24 *NcoI-Bam*HI restrikciós enzimekkel linearizált plazmidba építettük. Az így nyert pPIK1, pPI1 és pPK1 vektorokról arabinóz indukcióval *E. coli*ban tudunk induktív módon expresszálni PemI és PemK proteineket együtt, illetve antitoxin (PemI) és toxin (PemK) fehérjéket külön-külön.

A promóter részről itt is szükséges volt egy-kópiás mérőegységet konstruálnunk a precizitás és a genofor környezet mimikrije miatt. Ezt úgy végeztük, hogy az izolált promóter régiót, és feltételezhetően az operátort is tartalmazó, 133 bp hosszú inszertet beépítettük pMLB1109 *Acc*65I Klenow polimerázzal feltöltött helyére. Az elkészített pAPR2 plazmidot nukleotidsorrend meghatározás után *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáltuk és felülfertőztük, rekombináltattuk a mérőegységet a fág kromoszómára, λ RS45 fágtörzzsel. Ezt követően sorozatos passzálás és fertőzés során tiszta lizogén, kék színű kolóniákat szelektáltunk. A mérőegység így már integrálódott a λ RS45 fág segítségével az *E. coli* DH5 α genoforba, ahol stabilan integrálódott, egy kópiában. A mérőegységet tartalmazó törzsből kompetens sejteket készítettünk és transzformációval bejuttattuk a toxin, antitoxin expresszióra, illetve toxin és antitoxin koexpressziójára alkalmas vektorainkat (pPK1, pPI1 és pPIK1). Méréseinket tehát a genoforra épített promóter-operátor-*lacZ* fúziós riporter egységen és a TA modul különféle elemeit együtt és külön-külön 1% arabinóz jelenlétében induktív módon termelő plazmidokkal végeztük (23. ábra).



PemI PemK PemIK

23. ábra: TA fehérjék autoregulációs képességének vizsgálata

A PemIK fehérjék *in vivo* autoregulálják szintézisüket. x: – üres vektor, PemI, PemK és PemIK fehérjéket termelő vektorok, y: promóter aktivitás szálalék, 100% -nak tekintett az üres, fehérjét nem termelő vektor.

Az eredmények szerint, ha csak a PemI és PemK fehérjéket indukáljuk a promóter-operátor-*lacZ* fúziós riporter egységgel szemben, nem tapasztalunk promóter aktivitásbeli csökkenést. Ha a két fehérjét koexpresszióra alkalmas felállásban vizsgáljuk, akkor viszont 48%-ra esik le a relatív promóter aktivitás az arabinóz indukció után, a riportergén transzkripciójának csökkenése miatt. Ez azt jelenti, hogy van operátor a promótert is tartalmazó 133 bp-os inszerten, de az csak mindkét

protein együttes jelenléte mellett represszálható. Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a TA fehérjék komplexet alkotnak *in vivo* az operátorral és így biztosítják autoregulációjukat.

4.3.4. TA fehérjék komplex alkotásának vizsgálata

Az addikciós moduloknál azonban a másik lényeges kérdés, hogy a sejtben az operátoron kívül a toxin létrehoz-e az antitoxinnal valamilyen komplexet a sejtplazmában. A citoplazmás TA komplex kimutatására két *in vitro* kísérleti rendszert alakítottunk ki.

A fehérjéket kódoló ORF-eket pET 16 és pET 22 plazmidokba építettük. A pET16 vektorról Nterminális His-Tag fúziós fehérjéket lehet nagy hatékonysággal expresszáltatni *E. coli* BL21(DE3)pLys törzsben, a pET22 pedig C-terminális His-Tag jelölt proteinek túltermelésére alkalmas. A pemI antitoxint pemINde és pemIlowBam, a pemK toxint pemKNde up és pemKNotH, míg a TA modult együttes termelődését biztosító fragmentet pemINde és pemKNotH oligonukleotid primerekkel amplifikáltuk. Az antitoxint kódoló PCR fragmentet *NdeI-Bam*HI emésztés után *NdeI-Bam*HI hasítóhelyeknél linearizált pET16 vektorba építettük (pETI16). A toxin cisztronját tartalmazó fragmentet *NdeI-Not*I emésztés után, ugyanezen endonukleázokkal linearizált pET22 plazmidba építettük (pETK22). Mindkét cisztront hordozó inszertet *NdeI-Not*I hasítások után *NdeI-Not*I emésztett pET22 vektorba inszertáltuk (pEIK22). A pET116 a PemI fehérje Nterminális His-Tag fúzióval megnövelt 109 aminosav hosszú transzlátumának termelésére alkalmas, a pETK22 a PemK toxin C-terminális His-Tag jelölt, 128 aminosavat tartalmazó, rekombináns proteinjének expressziójára használható, a pEIK22 a PemI antitoxin 88 aminosavból felépülő natív formájának és a PemK toxin C-terminális His-Tag-el felruházott fehérjéjének koexpresszáltatására használható.

A rekombináns fehérjéket a QIAexpress System Ni-NTA oszlopon tisztítottuk az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján. A tisztított fehérjéket denaturáló PAGE és festés után, detektáltuk (24. ábra).



24. ábra.: A tisztított PemIK fehérjék komplex képzésének vizsgálata. M: molekulatömeg marker.
1. PemI_(Nhis), 2. PemI és PemK_(Chis), 3. PemK_(Chis)

A gélelektroforézis mutatja, hogy a koexpresszált TA fehérjék együtt is megjelennek a gélen (2. zseb), annak ellenére, hogy csak a PemK toxin volt His-Tag jelölt. A Ni-NTA oszlopon kötődő PemKHis rekombináns fehérje képes volt kötni a natív PemI antitoxint és az eluálással mindkét fehérje együtt távozott, ami bizonyítja a fehérje-fehérje kapcsolatok létrejöttét *in vitro* körülmények között.

Annak eldöntésére, hogy milyen moláris arányban vannak jelen a fehérjék operátor jelenléte nélkül a TA komplexben, glutáraldehid keresztkötési kísérletet végeztünk (25. ábra).



25. ábra.: Glutáraldehid keresztkötés eredményeként kimutatható PemIK komplex PAGE képe. M: molekulatömeg, **1.** tisztított PemI_(Nhis), **2.** tisztított PemI_(Nhis) + 1% glutáraldehid, **3.** tisztított PemIK_(Chis), **4.** tisztított PemIK_(Chis) + 1% glutáraldehid, **5.** tisztított PemK_(Chis), **6.** tisztított PemK_(Chis) + 1% glutáraldehid

A gélképen világosan látható a glutáraldehid keresztkötés eredménye a 25. ábra 4. zsebénél. A kezelés hatására csak ebben a reakcióban megjelenő 25 kDa körüli termék szerint a PemI és PemK fehérjék 1:1 arányban, heterodimerként, vannak jelen a citoplazmában jelen levő szabad komplexben.

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

Az operátor pontos azonasítására *in vitro* footprint és *in vivo*, mutációkkal módosított operátorok és TA fehérjék interakciójának *lac*Z riporterrendszerrel történő meghatározását végeztük.

A DN-áz I protekciós és hidroxil-gyök interferencia kísérletekhez a 133 bp hosszú pemPR up és pemPR low primerekkel amplifikálható DNS fragmentet használtuk. A kísérleteket az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint hajtottuk végre. A DN-áz I protekciós footprint eredményét az 26. ábra, hidroxil-gyök interferencia footprint képét a 27. ábra mutatja.



26. ábra: *A. tumefaciens pemIK* operátor azonosítása DN-áz I protekciós footprinttel. TCAG a referencia nukleotidok sorrendje. K: kontroll, fehérjével nem kezelt DNS, 1: 0,1 μg PemIK_(Chis), 0,2 μg PemIK_(Chis), 0,5μg PemIK_(Chis), 0,8μg PemIK_(Chis).



27. ábra.: *A. tumefaciens pemIK* operátor azonosítása hidroxil-gyök interferencia footprinttel. C: a specifikus nukleotid sorrend kontrollként használt citozin. 1: fehérje nélküli kezelt DNS fragment, 2: fehérjével kötést kialakító komplex, 3: szabad, nem kötött frakció

A DN-áz I footprint által kijelölt operátor rész nagyobb és részben asszimmetriát mutat a hidoxilgyök interferencia kísérlethez képest, ami nem meglepő, hiszen a DN-áz I enzim térigénye miatt a fehérje-DNS komplex az operátorok határait is lefedheti, így az enzim nem tud hasítani ezeken a protektált területeken sem. A pontosabb azonosításhoz használtuk az interferencia footprintet. Az eljárás során alkalmazott kémiai módosítás a fehérje-operátor komplex kialakulása előtt lehetővé teszi, hogy a TA komplex "szelektáljon" a DNS szálak közül és csak az épen maradt, módosítatlan operátor részekhez kötődik nagy affinitással. Ez által jelöli ki precízebben az operátort (28. ábra). A footprintek más operátort nem jelöltek a vizsgált régióban. A 28. ábra aláhúzott nukleotidjai a footprint kísérletek alapján kijelölnek egy 20 bp hosszú részleges palindrom régiót. Csak egy bázisnyi eltérés tatálható, melynek pont a közepén van a szimmetriatengelye és így 10-10 bp hosszú két félkötőhelyet tartalmazó elrendezést feltételezhetünk az operátor szerkezetét illetően. A két félkötőhely egyike átfed a transzkripciós starthellyel. Ez a represszió mechanizmusát is magyarázza, hiszen ily módon direkt gátolja a PemIK komplex az RNS polimerázt, ezáltal csökkenti a transzkriptumok képződésének valószínűségét.



28. ábra: Footprint kísérletek által kijelölt operátor régiók. *A. tumefaciens pemIK* operátor hidroxilgyök interferencia footprint (folytonos) és DN-áz I protekciós footprint (szaggatott) által kijelölt operátor régió. A diád szimmetriát mutató régió (aláhúzás). -18 és -22 a transzkripció starthelyeit jelölik a transzláció starthoz viszonyítva (1).

Az *in vitro* kísérletek által kijelölt operátort 5' irányban határoló adenin tényleges szerepe is feltételezhető az operátor funkció szempontjából, jóllehet ez felborítaná a szabályozó egység szimmetriáját.

Annak eldöntésére, hogy ténylegesen hol is van az operátor határa, olyan mutánsokat terveztünk, melyek *in vivo lacZ* riportergénen keresztül alkalmasak a kérdés tisztázására. A mutációkat kódoló szintetikus oligonukleotidokat a pMLB1109 *Acc*65I restrikciós enzimmel linearizált *Klenow* polimerázzal feltöltött helyére építettük, majd λ RS45 fágtörzs felhasználásával egy-kópiás mérőrendszert hoztunk létre. Az elkészített plazmidok a következők voltak, pPRM1 apr up és apr low szintetikus oligonukleotidok, a pPRM2 a aprac3 up és aprac3 low és a pPRM3 a aprtg4 up és aprtg4 low felhasználásával készült. A pPRM1 M1 mutáció (A→C) asszimmetrikus az operátor pozíciót tekintve és a szabályozó elem footprintek által kijelölt 5' határát hivatott eldönteni. A pPRM2 plazmid M2 mutációja szimmetrikus az operátor pozícióra nézve (T→A és A→C) és a részleges palindrom határait jelöli ki, míg a pPRM2 vektoron levő szintén szimmetrikus M3 mutáns operátor (G→T és C→G) belső bázisokat és a transzkripciós startpont részt érinti (29. ábra). Kontrollként a 133 bp hosszú vad operátor környezet szolgált (pAPR2 plazmid λ RS45 felhasználásával integráltatott mérőegysége). A TA modul expresszióját az arabinóz indukálható pPIK1 plazmid biztosította. A mérések eredményeit a 30. ábra foglalja össze.



29. ábra: Az operátor pontosítására szolgáló mutációk bemutatása. M1 A \rightarrow C mutáció, M2 T \rightarrow A és A \rightarrow C báziscserék, M3 G \rightarrow T és C \rightarrow G nukleotidcserék.



30. ábra: Mutáns operátor represszió értékei a PemI és Pemk komplex-el végzett in vivo mérések alapján. Wt.: vad operátorok, M1 A \rightarrow C mutáció, M2 T \rightarrow A és A \rightarrow C báziscserék, M3 G \rightarrow T és C \rightarrow G nukleotidcserék. R: represszió értéke

A vad operátorhoz képest az M1 mutáció bevezetése nem csökkentette a szabályozó egység működésének hatékonyságát. Az M2 mutáció mintegy felére csökkentette, az M3 pedig gyakorlatilag teljesen megszüntette a TA komplex represszió képességét az operátoron.

4.3.6. A pemIK fiziológiás szerepe

A TA modulok számos fiziólógiás szerepet töltenek be az élő sejtekben, ahogy az az irodalmi áttekintésből is kiderült. Az *A. tumefaciens pemIK* addikciós modulja legközelebbi rokonságot a *E.coli mazEF/pemIK* csoportjához mutatja. Ezen fehérjékre jellemző, hogy a transzkripció gátlásán keresztül elpusztítja a sejteket, vagy legalábbis jelentősen csökkenti a növekedésüket. Ennek

tanulmányozására a natív toxin, antitoxin és a két fehérje együttes expressziójára alkalmas kísérleti rendszert dolgoztunk ki. Alapvektorként a pET22 plazmidot használtuk, mert ez kimondottan fehérje túltermelésre szolgál szemben a gyengébb promóterrel rendelkező arabinóz operon szabályozása alatt álló pBAD24 vektorral. A toxin gént ezért pemKNde up és pemKlowBam, az antitoxint pemINde és pemIlowBam a két cisztront együtt pedig a pemINde és pemKlowBam oligonukleotid primerek segítségével PCR-el amplifikáltuk és a pET22 *NdeI-Bam*HI enzimekkel linearizált plazmidba építettük (pK22, pI22 és pIK22).

Az így kapott plazmidokat *E.coli* BL21(DE3)pLys3 törzsbe juttattuk és megvizsgáltuk, hogy a fehérjék túltermelése hogyan befolyásolja a növekedésüket. Negatív kontrollként fehérjét nem termelő pET22 plazmidot használtunk (31. ábra).



31. ábra: A *pemIK* addikciós modul PemK toxinjának hatása a *E.coli* sejtek növekedésére. **OD**₆₀₀: optikai denzitás 600 nm hullámhosszon mérve, **min:** indukció után eltelt idő percben.

A grafikon mutatja, hogy a csak antitoxint termelő pI22 plazmidot tartalmazó törzs az IPTG idukciót követően a kontrollal együtt normális növekedést mutatott. A toxint (PemK) túltermelő pK22 vektort tartalmazó törzs növekedése drámaian csökkent. Ezt az erősen gátló hatást a sejtek növekedésére az antitoxin jelenléte kompenzálni tudta (pIK22 vektor). A natív PemK toxin erőteljes expressziója tehát jelentősen csökkentette a sejtek növekedését.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

1- Előállítottunk olyan egy-kópiás, integratív mérőegységet, mely alkalmas *R meliloti*ban és *A*. *tumefaciens* fajokban a DNS-fehérje kölcsönhatások *in vivo* vizsgálatára

2- Alanin scaning felhasználásával meghatároztuk a *16-3* C represszor fehérje felismerő hélixében az egyes aminosavak fontosságát az operátor kötésben.

3- Előállítottunk O_{R2} és O_{L2} operátor mutánsokat, és *in vivo lac*Z riportergénen keresztüli méréssel meghatároztuk szerepüket a DNS-represszor komplexben. Célzottan a felismerő hélixben aminosavcserés represszor mutánsokat állítottunk elő, és meghatároztuk a represszió értékeket vad és mutáns operátorokkal szemben.

4- Izoláltunk egy megváltozott specificitású represszort, C^{Q37A} , mely a vad operátorokon gyengén, az $O_{R2}^{1-1/Cg}$ mutánson erősen represszál. Az $O_{L2}^{1-1/Cg}$ paralell mutáns esetében viszont az alanin mutációt hordozó represszor alacsony értéket ad, nem képes szupresszálni.

5- Ez egy eltérő dokkolást lehetővé tevő oldallánc-bázis kapcsolatot azonosít. Ezzel továbbfejlesztettük az eltérő hosszúságú operátorok és a C represszor interakciójáról alkotott modellt.

6- Izoláltunk egy pemIK homológ addikciós modult A. tumefaciens C58 törzsben.

7- Igazoltuk az aktív transzkripciót az operonról és meghatároztuk a transzkripciós startpontot.

8- Bizonyítottuk, hogy az operon autoregulált.

9- *In vitro* és *in vivo* módszerekkel meghatároztuk az operátort, bizonyítottuk a PemI és PemK fehérjék heterodimerizációját.

10- A PemK fehérjének a bakteriális növekedésre gyakorolt gátló hatását kimutattuk és bizonyítottuk, hogy a PemI antitoxin ezt feloldja.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. Az A. tumefaciens pemIK toxin-antitoxin modul jellemzése

A pemIK toxin-antitoxin modult plazmid stabilitási rendszerként azonosították az R100 plazmidcsaládnál E. coliban (Tsuchimoto és mtsai., 1988). Azóta számos kromoszómális homológját írták le. Ezek közül a legjobban tanulmányozottak a chpB és mazEF (chpA) E. coli kromoszómális TA modulok (Masuda és Ohtsubo, 1994, Metzger és mtsai., 1988). A Gram pozitív és Gram negatív baktériumok körében egyaránt előfordulnak, csupán Arheobaktériumoknál nem írtak még le ebbe a csoportba sorolható addikciós modult (Gerdes és mtsai., 2005). Az egy operonban található mazEF/pemIK TA modulok autoreguláltak. A DNS felismerést az antitoxin Nterminális része végzi, a toxin pedig korepresszorként stabilizálja a DNS-fehérje komplexet (Anantharaman és Aravind, 2003, Zhang és mtsai., 2003, Vaughn és mtsai., 2000). A két alegység specifikusan összekapcsolódva egy toxin-antitoxin (TA) komplexet alkot. A toxin aktivációját eltérő stresszhatásokra a TA komplexből az antitoxint lehasító specifikus proteázok végzik (Gottesman, 1996, Aizenman és mtsai., 1996, Christensen és Gerdes, 2004). Celluláris targetjeik mRNS molekulák, melyeket szekvencia specifikusan képesek hasítani, gátolva ezzel a transzlációt (Pedersen és mtsai., 2002). A plazmidon kódolt családtagjaikkal szemben a kromoszómán leírtak nem pusztítják el feltétlenül a gazdasejtet, csupán nagyon erősen gátolják a növekedésüket (Jensen és mtsai., 1995, Masuda és mtsai., 1993). A hasítás leginkább a kódoló régióban következik be in vivo körülmények között, ami a riboszómák szerepét feltételezi a specifikus vágás koordinálásában (Christensen és mtsai., 2003). A hőmérsékleti, éhezési, DNS-t károsító és antimikrobiális vegyületek (rifampicin) által kiváltott stressz hatására a TA modulok transzlációs gátlása a transztranszlációs mechanizmusoknak lehetőséget nyújt a hibás fehérjék és transzlációban elakadt riboszómák újrahasznosításában (Hazan és mtsai., 2004, Sat és mtsai., 2001, 2003). A bakteriális TA lókuszok eme családja bizonyíthatóan részt vesz a stressz által okozott bakteriális programozott sejthalál (PCD) indukálásában (Aizenman és mtsai., 1996), mely potenciális antimikrobiális célmolekulává emeli az addikciós modulokat.

A növénypatogén mikrobák körében az általunk leírt az első kísérletesen azonosított, részletesen jellemzett TA modul.

6.2. Transzkripciós starthely meghatározása

Első lépésként azt vizsgáltuk, hogy az adott operonban van-e aktív transzkripció és ha igen, akkor hány promóter található az ORF-ek előtt, esetleg létezik-e belső promóter. Az irodalom ugyanis

számos esetet ismer, amikor a prediktált TA modul nem aktív (Cole és mtsai., 2001, Pandey és Gerdes, 2005). Az *E. coli* estében a pemI-t 5'irányból határoló régiójában van a szabályozó egység egy promóterrel, nagyon közel a transzlációs starthelyhez (Tsuchimoto és mtsai., 1988). A mazEF esetében két, egymás közvetlen közelében levő promóter található (9. ábra), melyek közül a P2 több nagyságrenddel aktívabb és jelentősebb a transzkripció szempontjából (Marianovsky és mtsai., 2001). Ezek felépítése és szabályozása némileg eltér a klasszikus pemIK rendszerétől. A *mazF/pemK* toxinok átírása nem kimutatott belső promóterről, ellenben más családokba sorolt *higA* és ε gének esetében belső promóter biztosít transzkripciót a TA modul toxint kódoló elemeinek (Gerdes és mtsai., 2005).

Az általunk végzett primer extenzió eredménye szerint három lehetséges startpontról indulhat a transzkripció. Ezek a transzlációs starthelytől számított -18, -20 és -22 pozicióban levő nukleotidok, melyek közül a legerőteljesebb a transzlációs startponttól -22 nukleotidnyira található citozin. Érdekes, hogy az A. tumefaciens közeli rokonának számító R. meliloti ntrPR addikciós rendszerének szintén -22 bp a távolság a transzláció és a transzkripció iniciáló helyei között (Bodogai és mtsai., 2006). A pemK régióban nem találtunk belső promótert a primer extenzió alapján. Ezek alapján elmondható, hogy a két fehérje transzkripcióját a pemI cisztront 5' irányban megelőző promóter egység végzi. Ez az operon elrendezés a mazEF/pemIK család többi tagjánál is jellemző (Masuda és mtsai., 1993). A transzkripció során keletkező policisztronos mRNS molekulának 5' részén van az antitoxin és az ezt követő ORF-ről képződik csak a toxin fehérje a transzláció során. Ez teszi lehetővé azt, hogy a toxin képződésekor már a citoplazmában levő antidotum neutralizálja fiziológiás körülmények között a toxin hatását. A két ORF az A. tumefaciens esetében egy nukleotidnyit átfed, ami az ORF2 (pemK) transzlációs gyakoriságát hátrányosan befolyásolhatja, transzlációs frame shift, ezáltal a szintetizálódó feltételezett toxin fehérjék száma alacsonyabb az antitoxinhoz képest. A transzlációs frame shift biztosíthatja, hogy a kromoszómális addikciós modul ne pusztítsa el a sejtet a toxin aktivációja után sem, mert a nagy moláris feleslegben keletkező antitoxin képes neutralizálni részlegesen a szabad toxin molekulákat. Az E. coli pemIK operonban nem található átfedés a két fehérjét kódoló cisztron között (Tsuchimoto és mtsai., 1988), viszont a kromoszómális homológ chpBI és chpBK ORF-ek az általunk jellemzett A. tumefaciens pemIK rendszerhez hasonlatosan átfednek egymással (Masuda és mtsai., 1993).

6.3. A pemIK operon autoregulációja

Miután megbizonyosodtunk az általunk vizsgált DNS fragmentumról induló aktív transzkripcióról, a putatív addikciós modul működőképességét vizsgáltuk. Ezek során olyan kísérleti rendszereket

alakítottunk ki, melyek alkalmasak a TA modulok fehérje szintű kapcsolatainak kimutatására, továbbá a lehetséges operátorokkal kialakított interakciók vizsgálatára.

Méréseinket tehát a genoforra épített promóter-operátor-lacZ fúziós riporter egységen és a TA modul különféle elemeit együtt és külön-külön induktív módon termelő plazmidokkal végeztük E.coliban (23. ábra). Az eredmények szerint, ha csak a PemI és PemK fehérjéket termeltetjük, nem tapasztalunk promóter aktivitásbeli csökkenést. Az antitoxin önmagában in vivo tehát nem képes kötődni az operátor régióhoz. Ez az eredmény megfelel a más TA modulok körében tapasztaltaknak, hiszen csak a parDE lókusz esetében említik, hogy a ParD antitoxin fehérje önmagában is képes regulálni az operont ugyanolyan hatékonysággal, mint a TA komplex (Davis és mtsai., 1992, Eberl és mtsai., 1992, Roberts és mtsai. 1993). Ezen kívül jelzi azt is, hogy a heterológ expresszió alkalmas ebben az esetben a vizsgálatainkhoz, hiszen nem tapasztalható, hogy bármilyen E. coli faktor zavarná a méréseket fiziológiás körülmények között. Ha a két fehérjét koexpresszióra alkalmas felállásban vizsgáljuk, akkor viszont 48%-ra esik le a relatív promóter aktivitás. Ez azt jelenti, hogy van operátor a promótert is tartalmazó 133 bp-os inszerten de az csak mindkét protein együttes jelenléte mellett represszálható. Ez viszont a klasszikus TA rendszerekre jellemző viselkedés. Az operátor és a TA fehérjék kapcsolatának pontosabb megértését egy kokristályosítás oldaná meg, hiszen ez egyértelmű választ adna arra, hogy az operátoron heterotrimer vagy heterotetramer formában alkotnak-e komplexet a fehérjék. Arra is ez adna precíz választ, hogy a toxin milyen módon játszik szerepet korepresszorként az autoregulációban és milyen struktúrális alegységei vesznek részt a fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában.

Felmerül a kérdés, hogy mi lehet a magyarázat a viszonylag alacsony represszió értékre. Erre válaszként az szolgálhat, miszerint a külső körülmények, stresszhatások állandó monitorozása folyamatosan igényelhet egy állandó TA fehérje szintet, ami a rövid generációs idejű mikrobák esetén nagy előny, hiszen a transzkripció nagyon alacson szintről történő növelése idő és energiaigényes folyamat, ráadásul a transzkripció gátlása esetén -antibiotikum által okozott stressznem is feltétlenül lehetséges. Gyorsabb reagálást tesz lehetővé és valószínűleg adaptív előnyt is jelenthet a relatíve magas bazális transzkripciós aktivitás fenntartása. Ez annál is inkább igaz lehet, mert ha jobban belegondolunk a transzlációs frame shift miatt a toxin molekulák moláris aránya nagyon alacsony lehet az antitoxinhoz képest. A rendszer túlbiztosított olyan szempontból is, hogy a proteázok által feltételezett antitoxinbontás időbeliségét is képes kompenzálni oly módon, hogy a rövid aktiváció során a sok antitoxin molekula képes pufferolni, késleltetni a toxin aktivációt. Ha a stresszhatások folyamatosan, krónikusan aktiválják a proteázokat, akkor viszont az antitoxin lebomlás erőteljesebbé válik, ami a toxin aktivációhoz, antitoxin neutralizáció és autoreguláció elvesztéséhez vezet (Sat és mtsai., 2001). A két fehérje interakciója és aktív, autoregulációs képessége másik TA rendszerekre jellemző kérdés megválaszolását veti fel, mégpedig, hogy létezik-e kimutatható TA komplex szabadon a sejtben. Az addikciós moduloknál ugyanis ez a kapcsolódás teszi lehetővé a toxin neutralizálódását normál fiziológiás körülmények között (Masuda és mtsai., 1993).

6.4. TA fehérjék komplex alkotásának vizsgálata

Az 24. ábra gélelektroforézise mutatja, hogy a koexpresszált TA fehérjék együtt is megjelennek a gélen, annak ellenére, hogy csak a toxin volt His-Tag jelölt. A Ni-NTA oszlopon kötődő PemK_{His} rekombináns fehérje képes volt kötni a natív PemI antitoxint és az imidazol eluálással mindkét fehérje együtt távozott az oszlopról, ami bizonyítja a fehérje-fehérje kapcsolatok létrejöttét a feltételezett toxin és antitoxin fehérjék között. Annak eldöntésére, hogy milyen moláris arányban vannak jelen a fehérjék, operátor jelenléte nélkül, a TA komplexben, glutáraldehid keresztkötési kísérletet végeztünk (25. ábra). A glutáraldehid keresztkötés eredményeként a kezelés hatására csak a mindkét fehérjét tartalmazó reakcióban megjelenő 25 kDa körüli termék szerint a PemI és PemK fehérjék 1:1 arányban, heterodimerként, vannak jelen a citoplazmában jelen levő szabad komplexben. A PemI és PemK fehérjék külön nem alkotnak homodimert. Más TA rendszerek esetében jellemzően heterotetramer formában vannak jelen a TA fehérjék szabadon a sejtben, azonban az operátoron már eltérő módon alkothatnak komplexet. Az A. tumefaciens pemIK rendszer legközelebbi ortológjai közül csak az E.coli MazEF fehérjékről van pontos kristályszerkezet. Ebben a TA rendszerben például oldatban operátor nélkül 2:1 arányban heterohexamert alkotnak, a promóter-operátor egységen viszont végső soron 1:1 arányban alkotnak komplexet a toxin és antitoxin fehérjék, ráadásul a komponensek itt külön is képesek homodimereket alkotni (Kamada és mtsai., 2003).

Annak eldöntésére, hogy melyik régió felelős az antitoxin DNS kötésért és a fehérje-fehérje interakcióért a toxin fehérjével, érdemes lenne olyan mutációkat generálni a feltételezett protein régión, melyek funkcióvesztést okoznak, ezáltal meghatározhatóak lennének a kötésben fontos aminosav oldalláncok. Erre az alanin scanning nagyon alkalmas módszer.

6.5. A pemIK operátor azonosítása in vivo és in vitro módszerekkel

A DN-áz I protekciós és hidroxil-gyök interferencia kísérletekhez a 133 bp hosszú pemPR up és pemPR low primerekkel amplifikálható DNS fragmentet használtuk.

A 28. ábra aláhúzott nukleodidjai a footprint kísérletek alapján kijelölnek egy 20 bp hosszú fordítottan ismétlődő részleges palindrom régiót, csak egy bázisnyi eltérés tatálható, melynek pont a
közepén van a szimmetriatengelye és így 10-10 bp hosszú két félkötőhelyet tartalmazó elrendezést feltételezhetünk az operátor szerkezetét illetően. A két kötőhely megléte egyezik az irodalomban nagyon sok más TA modul szabályozó régiójának felépítésével. Az *E. coli pemIK* modul esetében 18 bp hosszú az operátor és két teljesen szimmetrikus, fordítottan ismétlődő részből áll, részlegesen étfedve a promóter -10-es régiójával (Tsuchimoto és mtsai., 1988). A kötőhelyek az általunk vizsgált esetben is átfednek a transzkripciós starthellyel és a feltételezett -10-es promóter box résszel. Ez a represszió mechanizmusát is magyarázza, hiszen ily módon direkt gátolja a PemIK komplex az RNS polimerázt, ezáltal csökkenti a transzkriptumok, saját fehérjéit kódoló mRNS, képződésének valószínűségét.

Az *in vitro* kísérletek által kijelölt operátort 5' irányban határoló adenin szerepe is kérdéses a szabályozási funkció szempontjából, jóllehet ez felborítaná a szabályozó egység szimmetriáját. Annak eldöntésére, hogy ténylegesen hol is van az operátor határa olyan mutánsokat terveztünk, mely *in vivo lacZ* riportergénen keresztül alkalmasak a kérdés tisztázására. (29. ábra)

A pPRM1 M1 mutáció (A \rightarrow C) asszimmetrikus az operátor pozíciót tekintve, a szabályozó elem footprintek által kijelölt 5' határát hivatott eldönteni. A pPRM2 plazmid M2 mutációja szimmetrikus az operátor pozícióra nézve (T \rightarrow A és A \rightarrow C) a diád szimmetriát mutató részleges palindrom határait jelöli ki, míg a pPRM2 vektoron levő szintén szimmetrikus M3 mutáns operátor (G \rightarrow T és C \rightarrow G) belső bázisokat és a transzkripciós startpont részt érinti (29. ábra).

A vad operátorhoz képest az M1 mutáció bevezetése nem csökkentette a szabályozó egység működésének hatékonyságát, tehát nem része a szabályozó egységnek. Az M2 mutáció mintegy felére csökkentette az M3 pedig gyakorlatilag teljesen megszüntette a represszió képességét az operátoron a TA komplexnek. Az M2 mutáció okozta drámai repressziócsökkenés kijelöli az operátor szélső határait. A mért eredmények világosan jelölik az operátor pontos méretét és nukleotidsorrendjét, TGTGCTACAT-ATGTTGCACA. Az M3 mutáció pedig jelzi, hogy a TA komplex legfőbb autoregulációs feladata a saját operon transzkripciójának gátlása, szabályozása, hiszen a promóter részt érintő sérülés az autoreguláció teljes megszűntét eredményezte. A hidroxilgyök interferencia footprint jelzi, hogy a két félkötőhely nem egyenértékűen módosul a kémiai kezelés hatására, hiszen némileg asszimmetrikus protekció figyelhető meg a gélen az eltérő operátor részek iránt a represszor részéről (27. ábra). Érdemes lenne olyan mesterséges, szimmetrikus félkötőhelyeket és csak egy félkötőhelyet tartalmazó konstrukció létrehozása, amely tisztázná a félkötőhelyek pontos szerepét és hierarchiáját.

6.6. A PemIK rendszer fiziológiás szerepe

A TA modulok számos fiziólógiás szerepet tölthetnek be az élő sejtekben. Az A. tumefaciens pemIK addikciós modulja legközelebbi rokonságot az E. coli mazEF/pemIK csoportjához mutatja. Ezen fehérjékre jellemző, hogy a transzkripció gátlásán keresztül elpusztítják a sejteket vagy legalábbis jelentősen csökkentik a növekedésüket. A kromoszómán található TA modulokra, mint a mazEF és chpBIK, az utóbbi jellemző. Az általunk vizsgált addikciós rendszer szabályozó része viszont szerkezetileg inkább hasonlít a plazmid stabilitási faktorként ismert *E. coli pemIK* génekhez. Ennek tanulmányozására a natív toxin, antitoxin és a két fehérje együttes expressziójára alkalmas kísérleti rendszert dolgoztunk ki. A csak antitoxint teremelő pI22 plazmidot tartalmazó törzs (31. ábra) a kontrollal együtt normális növekedést mutatott. A toxin (PemK) túltermelő pK22 vektort tartalmazó törzs növekedése drámaian csökkent. Ezt a gyenge, erősen gátolt növekedést csak az antitoxin jelenléte tudta kompenzálni (pIK22 vektor). Ez egy klasszikus kísérlet a TA modulok jellemzése során és a kapott eredmények teljesen beleillenek a család más tagjainál tapasztaltakba (Masuda és mtsai., 1993, Jensen és mtsai., 1995). Amikor a kísérlet során a kontroll csoport elérte az exponenciális fázist, az indukciót követő 150 perc után, még nem volt látványos eltérés a növekedési görbék tekintetében, viszont a stacioner fázis elérésekor, OD₆₀₀≈2, a csak toxint termelő baktériumok csupán OD₆₀₀≈0,4-0,5 értéket mutattak és nem emelkedett a mért adat a későbbiekben sem jelentősen. A 390. percben a kontroll és az antitoxint (PemI), illetve a TA fehérjéket együtt termelő sejtek közel hatszor magasabb optikai denzitást mutattak a csak toxint termelőkkel összevetve. A natív PemK toxin erőteljes expressziója tehát jelentősen csökkentette a sejtek növekedését. A gátlás pontos mechanizmusa még tisztázandó, aminek érdekében érdemes lenne az mRNS bontó aktivitást kimutatni. Erre nagyon hatékony lenne egy qPCR alapú vizsgálat. Ajánlott egy pemIKA A. tumefaciens törzs előállítása, melynek fiziológiás vizsgálata és patogenezisének tanulmányozása rávilágíthat a pontosabb hatásmechanizmusokra és interakciókra.

Az eredmények összegzéseként javasolunk egy modellt az *A. tumefaciens pemIK* addikciós modul operonjának működésére (32. ábra).

Negatív visszacsatolás





32. ábra: Javasolt modell az A. tumefaciens pemIK operon működésére.

A *pemI* és *pemK* cisztronok 1 bp átfedéssel rendeződnek a *pemI* előtt 5' irányban levő promóteroperátor után. A TA komplex heterodimert alkot a citoplazmában és képes a saját operont autoregulálni. A PemK toxin túltermelése jelentősen csökkenti a sejtek növekedését.

6.7. A. tumefaciens pemIK operonjának lehetséges biotechnológiai hasznosítása

6.7.1. Plazmid stabilizáció

Plazmidba építve a *pemIK* addikciós modul akár antibiotikum szelekció nélkül is képes stabilizálni a rekombináns plazmidot. Ilyen rendszert hoztak létre *E. coli* esetében a *parDE* TA modul plazmidba építésével (Gerdes, 1988, Pecota és mtsai., 1997).

6.7.2. Pozitív szelekciós vektor

A transzgénikus növények előállítása során előszeretettel alkazmazott *A. tumefaciens*ből olyan törzset kell előállítani, melyben a *pemIK* rendszer delécióval kiejtett a kromoszómáról. A klónozáshoz használt plazmidba csak a toxin gént építjük be egy vad *A. tumefaciens* vagy antitoxint is termelő *E. coli* törzsben fenntartva. A toxint kódoló cisztronba tudunk beépíteni DNS fragmenteket. A *pemIK* Δ antitoxin deficiens szenzitív törzsbe elektroporálva a konstrukciót, csak a rekombináns plazmid képes fennmaradni, mert az inszertet nem tartalmazó, toxint termelő nem rekombináns kolóniák elpusztulnak, vagy legalábbis nagyon gyenge növekedésük miatt a háttérbe

szorulnak. A későbbiekben a revertáns kolóniák száma is csökken, ezáltal a rekombináns plazmid stabilitása is nő. Ilyen plazmid rendszert állítottak elő az *E. coli*ban pozitív szelekcióra a *ccdB* és *kid* gének felhasználásával (Bernard és mtsai., 1994)

6.7.3. Önmegsemmisítő baktériumok

A transzgénikus növények és tranziens expressziós rendszerek előállítása során gyakran felmerül az igény az *A. tumefaciens* reziduális infekciós sejtek elpusztítására, mely antibiotikum kezelés hatására sem mindíg hatékony. A toxin gének indukált módon történő túltermeltetése szinergista lehet az antibiotikum hatással bizonyos körülmények között. Az addikciós toxinokat a mikrobiális kontamináció csökkentésére lehet felhasználni.

6.7.4. A pemIK TA komplex potenciális antibiotikum target

A legtöbb szabadon élő humán-, állat- és növénypatogén baktérium tartalmaz TA modulokat (13). A növényvédelem és a medicina folyamatos kihívással néz szembe az antibiotikum rezisztens mikrobák egyre szélesebb körű elterjedése miatt, ami új potenciális antimikrobiális formulák keresését igényli. A toxin-antitoxin direkt interakció gátlásával illetve a toxin aktiváció szignál útvonalának manipulálása bizonyos molekulákkal, új antibiotikumokkal, kiváló lehetőséget ad a humán, állat és növénypatogének elleni harcban a védekezésre a betegségek kórokozói ellen.

*E. coli*ban már izoláltak is egy olyan pentapeptidet, melynek tisztított, naturális, formája képes volt nagyon hatékony bakteriosztatikumként hatni a *mazEF* addikciós rendszeren keresztül (Kolodkin-Gal és mtsai., 2007).

6.8. 16-3 bakteriofág egy kópiás mérőegységének előállítása

A *16-3* fág integrációs rendszerét felhasználva előállítottunk egy olyan mérőegységet, mely alkalmas lehet *R. meliloti*ban a pontmutációk, aminosavcserék hatásainak nagyon precíz vizsgálatára a *16-3* fág C represszor és operátorainak kölcsönhatása során. Ennek a rendszernek a felhasználásával végső soron egy megváltozott specifictású represszor fehérje izolálása volt a cél.

A *R. meliloti* esetében az O_{L2} operátor-promóter -C represszor egység R=0,78 repressziót mutat, az O_{R2} esetében ez az érték R= 0,81. Az *A. tumefaciens*nél az O_{L2} operátor-promóter -fág C represszor egység R= 0,80 repressziós értéket mutat, az O_{R2} esetében ez R= 0,83. Ezek az eredmények megerősítik a korábban *E. colib*an λ RS45fág felhasználásával előállított egy kópiás rendszeren kapott eredményeket, melyek gyakorlatilag ugyanilyen repressziót mutatka a két vad operátoron

(Papp és mtsai., 2002). Az is megfigyelhető, hogy a hosszabb operátor (O_{R2}) mindkét fajnál kis mértékben magasabb repressziót adott, továbbá a rövidebb operátort tartalmazó promóterhez képest magasabb alapaktivitást mutatott (14 MU a *R. meliloti* és 21 MU az *A. tumefaciens* esetében). Az O_{R2} operátort tartalmazó promóter-operátor egység által produkált magasabb alapaktivitás a két promóter szerkezetében levő minimális eltéréssel magyarázható, ami nem befolyásolta a mért represszió értékeket.

6.9. Alanin scanning

Az *in vivo* mérések alapján elmondhatjuk, hogy a pPM232 plazmidról átíródó vad represszor hatékonysága a vad operátorokon megegyezik a pPM238 vektorról hajtott *MlsI- EagI* cserélhető panelt tartalmazó represszorral, tehát az új restrikciós hely generálása nem befolyásolta a transzlációt és a funkciót, ami alkalmassá teszi a további represszor mutációk tesztelésére.

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

6.10. Operátor mutánsok vizsgálata

A pGSB1 plazmid felhasználásával előállított komplett operátor mutáns sorozat tesztelése a vad represszorral figyelemre méltó eredményeket adott.

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

nukleotidokat szimmetrikusan megfordítottuk. Ilyenek az 1-1esetben az $O_{R2}^{1-1/ta}$ (R=0,6), a 3-3 mutációk közül a $O_{R2}^{3-3/ta}$ (R=0,58), a 4-4 csoprtban a $O_{R2}^{4-4/ta}$ (R=0,53), melyek mindegyikében az eredeti A-T pozíciókban T-A cseréket generáltunk, illetve a 2-2 csoport mutációi közül a $O_{R2}^{2-2/gc}$, melynél a C-G bázisokat cseréltük le G-C nukleotidokra. Mindegyik mutáció az adott csoport legmagasabb R értéket mutató tagjai közé sorolható. Érdekes, hogy a legkisebb hatású változások a mért repressziókban ennek ellenére az $O_{R2}^{3-3/gc}$ operátornál (R=0,73), A-T \rightarrow G-C cserében, és az $O_{R2}^{4-4/cg}$ mutáció bevezetésénél mérhető (A-T \rightarrow C-G csere, R=0,66). Megfigyelhető általában, hogy a 2-2 és 1-1 pozíció $O_{R2}^{1-1/gc}$ mutációi adták a legnagyobb represszió csökkenést, így ezek szolgálhatnak alapul a megváltozott specificitású represszor izolálása során az operátor oldalról. Ezekkel a nukleotidokkal a felismerő hélix 1. és 2. aminosavainak oldalláncai tarthatnak kapcsolatot, ezért a későbbiekben ebben a régióban végeztünk mutagenezist.

6.11. Megváltozott specificitású represszor vizsgálata vad és mutáns O_{R2} operátorokon

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

A mutáns O_{R2} típusú operátorokon és a számos aminosavcserés represszorral kapott mérési eredményekből megállapíthatjuk, hogy a represszorban végzett aminosavcserék minden esetben drámaian csökkentették a fehérje funkcióját minden operátoron vizsgálva. Ez alól kivétel az $O_{R2}^{1-1/cg}$ operátor viselkedése a C^{Q37Ala} represszor mutánssal mérve. Ebben az esetben a vad O_{R2} operátoron nagyon alacsony represszió értéket mértünk az alanin cserét hordozó represszorral (R=0,11), ellenben a C-G mutációt hordozó operátoron a vad represszor vad operátoron mért értékét is meghaladó nagyon magas repressziót kaptunk (R=0,90). A vad repersszor a mutáns $O_{R2}^{1-1/cg}$ operátoron csak közepes R értéket mutatott (R=0,52), így a mutáns alanin cserés represszorunkról elmondhatjuk, hogy szupresszálni képes az operátor mutációt, ami annyit jelent, hogy sikerrel izoláltunk egy megváltozott specificitású szabályozó fehérjét egy O_{R2} típusú operátoron.

Már előzőekben ismert, hogy 16-3 C represszor hatékony repressziót ad a 434 fág operátorán, ahogyan a 434 fág represszora hatékonyan működik a 16-3 O_{R2} operátoron (Dallmann és mtsai., 1987). A megváltozott specificitású szabályozó fehérje izolálása megerősíti azt a korábbi feltételezést, mely szerint a Gln37 oldallánca, a felismerő hélix első aminosavja kapcsolódik az operátor első A bázisához a DNS-fehérje komplexben. Ennek alapja az a megfigyelés, hogy a 434 represszornál a Gln28 pozíció a felismerő hélix első aminosavja ebben a rendszerben, alanin cseréje szintén szupressziót ad abban az esetben, ha az operátor A-T \rightarrow T-A szimmetrikus báziscserés

mutációt hordoz (Wharton és Ptashne, 1987). A *16-3* esetében az A-T \rightarrow C-G szimmetrikus báziscsere által mutatott megváltozott specificitás bázis specifikus, mert a másik két nukleotiddal nem mutat hatékony repressziót. Mindez azt feltételezi, hogy a rövid alanin oldallánc új és specifikus kapcsolatot képes kialakítani a C-G bázisokkal, mely nem funkcióképes a vad glutamin oldallánccal.

6.12. Megváltozott specifitású mutáns represszor viselkedése OL2 típusú operátoron

Az igazán érdekes része csak most érkezett el munkánknak, hiszen az $O_{R2}^{1-1/cg}$ mutációt a hosszabb operátoron képesek voltunk szupresszálni egy C^{Q37Ala} mutáns represszorral de vajon hogy viselkedik ez a felállás a rövidebb operátor esetében? A tulajdonképpeni cél eldönteni, hogy a represszor ugyanazokat az oldalláncokat használja-e mindkét operátor esetében a komplex kialakítás során vagy eltérő atomi kapcsolatokat alakít ki a különféle operátorokkal a felismerés folyamán.

A rövidebb mutáns operátoron, $O_{L2}^{1-1/Cg}$, az alanin szubsztitúciós, C^{Q37Ala} , és a vad represszor egyaránt alacsony R értéket adott (R=0,29 illetve 0,24).

A kapott eredmények azt tükrözik, hogy az alanin mutáns represszor nem képes szupresszálni az 1-1 pozícióban C-G mutációt hordozó rövidebb operátort. A rövid, hidrofil alanin oldallánc csak az $O_{R2}^{1-1/cg}$ típusú operátor mutánssal alakít ki nagyon erős, új kontaktust. A pontos molekuláris mechanizmust csak egy kristályszerkezet tudná megoldani.

Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az O_{L2} típusú szabályozó elem más módon alakít ki specifikus kapcsolatot a fehérjével a komplex képzés során.

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

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A 16-3 bakteriofág C represszor fehérjéjének és operátorainak kölcsönhatása nagyon izgalmas kérdéskör. A mechanizmus pontosabb megismeréséhez előállítottunk egy R. meliloti és A. tumefaciens fajokban egyaránt hatékony integratív, egy-kópiás mérőegységet. Alanin scanning felhasználásával meghatároztuk, hogy melyek a legfontosabb aminosavak a represszor felismerő hélixében. Az O_{R2} operátorban szimmetrikus mutációkat generáltunk mindegyik pozícióban és megvizsgáltuk a mutációk hatásait a vad represszorral kialakított specifikus kapcsolódásban. Eredményeink alapján elmondható, hogy az 1-1 és 2-2 pozíciók megváltoztatása volt a legnagyobb hatású a represszor fehérje kötése szempontjából. A fehérje oldaláról a felismerő hélix 1. és 2. Gln aminosavjait cseréltük le más aminosavakra és megnéztük, hogy milyen hatása volt vad és mutáns operátorokon az egyes mutációknak. Sikeresen izoláltunk egy megváltozott specificitású, Gln37-Ala37 aminosavcserés represszort, mely a mutáns O_{R2} operátoron pedig magas repressziót, a vad O_{R2} operátoron alacsony repressziót adott. Mindezek mellett a vad C represszor a mutáns O_{R2} operátoron nagyon gyenge funkciót adott. Ugyanezt a paralell mutációt az OL2 operátorba beépítve nem találtunk szupressziót a megváltozott specificitású represszorral vizsgálva. Mindezen eredmények a két eltérő operátoron azt mutatják, hogy bár hasonló funkcionális hatékonysággal bírnak, mégis más felismerési elrendeződést, dokkolási mintázatot mutat a fehérje homodimer az eltérő operátorokon. A represszor ilyen nagy mértékű flexibilitása megerősíti a rotációsan flexibilis protein homodimer modell hipotézisét.

Az *A. tumefaciens pemIK* homológ addikciós modul kiváló lehetőséget mutat új antibiotikumok kifejlesztésére a növényvédelem számára. A putatív TA rendszerről bebizonyítottuk, hogy a két ORF aktív transzkripciós egységként működik és meghatátoztuk a transzkripció startpontját. A két proteint koexpresszálva bizonyítottuk az autoregulációs képességüket. Kimutattuk, hogy a toxin és antitoxin fehérjék heterodimert képeznek a citoplazmában. Footprint és mutációs analízissel meghatároztuk az operátor régiót. A toxin fehérje túltermelésével demonstráltuk a sejtek növekedésére gyakorolt negatív hatását. Mindezen eredmények lehetővé tették egy olyan operon modell elkészítését, mely igazolja a két fehérje addikciós modul szerepét.

8. SUMMARY

The interaction of the 16-3 bacteriophage C repressor protein and their differentially structured operators are particularly exciting phenomena. We constructed an integrative single-copy set-up *in* vivo reporter system to study the mechanism of the interaction of the phage repressor protein and their cognate operators. The in vivo reporter system can be used both in R. meliloti and in A. tumefaciens strains equal. We have identified the role of the amino acid side chains of the C repressor protein's recognition helix in the course of the operator binding by alanine scanning. Moreover we have introduced symmetric nucleotides changes in each position of the wild type operator sequences in order to demonstrate how important each nucleotide of the operator protein binding sites are during the process of DNA-protein complex formation. In the light of our data, the changes of the operator nucleotides at positions 1 and 2 show the highest influence on the binding of C repressor protein. Moreover we introduced diverse amino acid exchange at the Gln37 and Gln38 positions, of the C repressor's recognition helices. We analysed the interactions between the C repressor proteins containing different amino acid replacements and the mutated operators at symmetric positions. We isolated a C repressor mutant with altered binding specificity caused by a Gln37-Ala37 amino acid exchange. The mutant C repressor protein shows low repression value with the wild-type O_{R2} operator although it has an increased affinity to the mutant operator $O_{R2}^{1-1/cg}$ similar to the interaction of the wild-type O_{R2} and the wild C repressor protein. Unexpectedly, the C^{Q37A} repressor, contrary to its binding to the mutant $O_{R2}^{1-1/cg}$ operator, did not bind well to its parallel O_L version, the $O_{L2}^{1-1/cg}$ mutant. This means that the spatial relationship between the major grooves and the recognition helixes at the interface are different in the two kinds of complexes, implying that the 16-3 repressor may use different docking arrangements to recognize O₁-type and O_R-type operators. In the light of our new results, we can extend our previously suggested "rotationally flexible protein homodimers" model by drawing conclusions concerning the binding domains.

The putative *pemIK* addiction module of the *A. tumefaciens* is a probable antibiotic target for the crop production. We demonstrated that the two ORFs are the transcriptional units of the *pemIK* operon moreover we isolated the promoter region and the transcription start point was identified. The operon auto regulation was demonstrated by co expression of the PemI antitoxin and the PemK toxin. The cytoplasmic TA complex and the protein-protein interaction of the toxin and antitoxin molecules were detected. The *pemIK*'s operator was characterised by footprint analysis and mutational screen. The negative effect to the cell growth was demonstrated by the PemK toxin peptide over expression. Summarising our results, we established a model describing the structure and function of the newly characterised *pemIK* addiction module of the *A. tumefaciens*.

9. MELLÉKLETEK

M1: Irodalomjegyzék

Afif, H., Allali, N., Couturier, M. & Van Melderen, L. (2001): The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison–antidote system. *Mol. Microbiol*, **41**, 73–82

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. & Glaser, G. (1996): An *Escherichia coli* chromosomal 'addiction module' regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 6059–6063

Anantharaman, V., Aravind, L. (2003): New connections in the prokaryotic toxin–antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol*, **4**, R81

Bahassi, E. M., Salmon, M. A., Van, M. L., Bernard, P. & Couturier, M. (1995): F plasmid CcdB killer protein: *ccdB* gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Mol. Microbiol*, **15**, 1031–1037

Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. (2004): Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, **305**, 1622–1625

Banerjee S. K., Luck B. T., Kim H. Y. and Iyer V. N. (1992): Three clustered origins of replication in a promiscuous-plasmid replicon and their differential use in a PolA+ strain and a delta PolA strain of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **174**, 8139-8143.

Barker, M. M., Gaal, T. & Gourse, R. L. (2001.a): Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Bio*, **305**, 689–702

Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001. b): Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol,* **305**, 673–688

Bernard, P., Bernard P, Kézdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M. (1993): The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol*, **234**, 534–541

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., Couturier, M. (1994): Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene*, **148**, 71–74

Bickle, T. A., Kruger, D. H. (1993): Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev*, 57, 434–450
Birnboim H. C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523

Black, D. S., Irwin, B., Moyed, H. S. (1994): Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol;* **176**, 4081–4091

Black, D. S., Kelly, A. J., Mardis, M. J., Moyed, H. S. (1991): Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol*, **173**, 5732–5739

Blaha B., Semsey S., Ferenczi S., Csiszovszki Z., Papp P. P. and Orosz L. (2004): A proline tRNA(CGG) gene encompassing the attachment site of temperate phage 16-3 is functional and convertible to suppressor tRNA. *Mol Microbiol*, **54**, 742-754

Boe, L., Gerdes, K., Molin, S. (1987): Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol*, **169**, 4646–4650

Bravo, A., de Morrontegui, T. G., Diaz, R. (1987): Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol. Gen. Genet*, **210**, 101–110

Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, Wyns L, Loris R. (2005): Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci*, **30**, 672-9 Review

Camacho, A. G., Misselwitz R., Behlke J., Ayora S., Welfle K., Meinhart A., Lara B., Saenger W., Welfle H., Alonso JC. (2002): *In vitro* and *in vivo* stability of the ε2ζ2 protein complex of the broad host-range. *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system. *Biol. Chem*, **383**, 1701–1713

Cashel, M., Gentry, D., Hernandez, V. J., Vinella, D (1996): in *Escherichia coli* and *Salmonella* (ed. F. C. Neidthardt) 1458–1496 (ASM, Washington DC, 1996)

Cavanagh, J. (2000): Novel DNA binding domain and genetic regulation model of *Bacillus subtilis* transition state regulator *abrB. Nature Struct. Biol*, **7**, 1139–1146

Ceglowski, P., Boitsov, A., Karamyan, N., Chai, S., Alonso, J. C. (1993): Characterization of the effectors required for stable inheritance of *Streptococcus pyogenes* pSM19035- derived plasmids in *Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet*, **241**, 579–585

Chang, S., Cohen, S. N. (1977): *In vivo* site-specific genetic recombination promoted by the *Eco*RI restriction endonuclease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 4811–4815

Chatterji, D., Kumar, O. A. (2001): Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr. Opin. Microbiol*, **4**, 160–165

Christensen, S. K., Gerdes, K. (2003): RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol. Microbiol*, **48**, 1389–1400

Christensen, S. K., Gerdes, K. (2004): Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol. Microbiol*, **53**, 587–597

Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., Gerdes, K. (2001): RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 14328–14333

Christensen, S. K., Pedersen, K., Hansen, F. G., Gerdes, K. (2003): Toxin–antitoxin loci as stress-responseelements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol*, **332**, 809–819

Clissold, P. M., Ponting, C. P. (2000): PIN domains in nonsensemediated mRNA decay and RNAi. *Curr. Biol*, 10, R888–R890

Cole, S. T. Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R,

Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T,

Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA,

Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. (2001): Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, **409**, 1007–1011

Critchlow, S. E., O'Dea, M.H., Howells, A.J., Couturier, M., Gellert, M., Maxwell, A. (1997): The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. *J. Mol. Biol.* **273**, 826–839

Csiszovszki Z., Buzas Z., Semsey S., Ponyi T., Papp P. P., Orosz L. (2003): immX immunity region of rhizobium phage *16-3*: two overlapping cistrons of repressor function. *J Bacteriol*, **185**, 4382-4392

Dallmann G., Marincs F., Papp P., Gaszner M., Orosz L. (1991): The isolated N-terminal DNA binding domain of the c repressor of bacteriophage *16-3* is functional in DNA binding in vivo and in vitro. *Mol Gen Genet*, **227**, 106-112

Dallmann G., Olasz F., Orosz L. (1980): Virulent mutants of temperate *Rhizobium meliloti* phage *16-3*: loci avirC and avirT, and increased recombination. *Mol Gen Genet*, **178**, 443-446

Dallmann G., Orosz L., Sain B. (1979): Restriction mapping of DNA of temperate *Rhizobium meliloti* phage *16-3*: comparison of genetic and physical maps indicates a long, genetically silent chromosomal arm. *Mol Gen Genet*, **176**, 439-448

Dallmann G., Papp P., Orosz L. (1987): Related repressor specificity of unrelated phages. *Nature*, 330, 398-401

Davis, T. L., Helinski, D. R., Roberts, R. C. (1992): Transcription and autoregulation of the stabilizing functions of broad-hostrange plasmid RK2 in *Escherichia coli, Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa. Mol. Microbiol,* **6**, 1981–1994

de la Hoz, A. B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernández, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C., Ceglowski, P. (2000): Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 728–733

Dorgai L., Olasz F., Németh K. (1986): Lysogenic control of temperate phage *16-3* of *Rhizobium meliloti* 41 is governed by two distinct regions. *Mol Gen Genet*, **205**, 568-571

Dorgai L., Olasz F., Berényi M., Dallmann G., Páy A., Orosz L. (1981): Orientation of genetic and physical map of *Rhizobium meliloti* temperate phage *16-3*. *Mol Gen Genet*, **182**, 321-325

Dorgai L., Papp I., Papp P., Kalman M., Orosz L. (1993): Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage *16-3* of *Rhizobium meliloti* 41. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1671

Dorgai L., Polner G., Jonas E., Garamszegi N., Ascher Z., Pay A., Dallmann G., Orosz L. (1983): The detailed physical map of the temperate phage *16-3* of *Rhizobium meliloti* 41. *Mol Gen Genet*, **191**, 430-433

Duda B., Orosz L. (1980): Correlation between map position and phenotype of CTI mutants in the c cistron of *Rhizobium meliloti* phage *16-3*. *Genetics*, **96**, 321-329

Eberl, L., Givskov, M., Schwab, H. (1992): The divergent promoters mediating transcription of the *par* locus of plasmid RP4 are subject to autoregulation. *Mol. Microbiol*, **6**, 1969–1979

Ebright, R. H. (1991): Identification of amino acid-base pair contacts by genetic methods. *Methods Enzymol*, **208**, 620–640.

Erdei S., Dudas B., Orosz L., Duda E. (1982): Identification of structural proteins of *Rhizobium* meliloti temperate phage 16-3. J Gen Virol, 62, 145-152

Falla, T. J., Chopra, I. (1999): Stabilization of *Rhizobium* symbiosis plasmids. *Microbiology* 145, 515–516

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

Figurski D. H., Helinski D. R. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1648-1652

Galvani, C., Terry, J., Ishiguro, E. E. (2001): Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes. *J. Bacteriol*, **183**, 2700–2703

Ganyu, A., Z. Csiszovszki, T. Ponyi, A. Kern, Z. Buzas, L. Orosz,, P. P. Papp. (2005): Identification of cohesive ends and genes encoding the terminase of phage *16-3*. *J. Bacteriol*, **187**, 2526–2531.

Gazit, E., Sauer, R. T. (1999): The Doc toxin and Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. *J. Biol. Chem*, **274**, 16813–16818

Gerdes, K. (1988): The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. *Bio/Technology*, **6**, 1402–1405

Gerdes, K. (2000): Toxin–antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol*, **182**, 561–572

Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. (2005): Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 371-82. Review.

Goodner,B., Hinkle,G., Gattung,S., Miller,N., Blanchard,M.,Qurollo,B., Goldman,B.S., Cao,Y., Askenazi,M., Halling,C.,Mullin,L., Houmiel,K., Gordon,J., Vaudin,M., Iartchouk,O., Epp,A.,Liu,F., Wollam,C., Allinger,M., Doughty,D., Scott,C., Lappas,C., Markelz,B., Flanagan,C., Crowell,C., Gurson,J., Lomo,C., Sear,C., Strub,G., Cielo,C., Slater,S. (2001): Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, **294**, 2323-2328

Gotfredsen, M., Gerdes, K. (1998): The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxinantitoxin gene family. *Mol. Microbiol*, **29**, 1065–1076

Gottesman, S. (1996): Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet, **30**, 465–506

Grady, R., Hayes, F. (2003): Axe–Txe, a broad-spectrum proteic toxin–antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate *of Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol*, **47**, 1419–1432

Gronlund, H., Gerdes, K. (1999): Toxin–antitoxin systems homologous with *relBE* of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. *J. Mol. Biol*, **285**, 1401–1415

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J. Bacteriol*, **177**, 4121–4130

Hargreaves, D., Santos-Sierra, S., Giraldo, R., Sabariegos-Jareño, R., de la Cueva-Méndez, G., Boelens, R., Díaz-Orejas, R., Rafferty, J.B. (2002): Structural and functional analysis of the *kid* toxin protein from *E. coli* plasmid R1. *Structure, (Camb.)* **10**, 1425–1433

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580

Harrison S. C, Aggarwal A. K. (1990): DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu Rev Biochem*, **59**, 933-69.

Hazan, R., Sat, B., Engelberg-Kulka, H. (2004): *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol*, **186**, 3663–3669

Hazan, R., Sat, B., Reches, M., Engelberg-Kulka, H. (2001): Postsegregational killing mediated by the P1 phage 'addiction module' *phd-doc* requires *the Escherichia coli* programmed cell death system *mazEF*. *J. Bacteriol*, **183**, 2046–2050

Hendrix R. W. (2002): Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol, 61, 471-480

Hengen, P. N., S. L. Bartram, L. E. Stewart, T. D. Schneider. (1997): Information analysis of Fis binding sites. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4994–5002

Ivanov, V. I., L. E. Minchenkova, B. K. Chernov, P. McPhie, S. Ryu, S. Garges, A. M. Barber, V. B. Zhurkin, S. Adhya. (1995): CRP-DNAcomplexes: inducing the A-like form in the binding sites with an extended central spacer. *J. Mol. Biol*, **245**, 228–240

Jensen, R. B., Grohmann, E., Schwab, H., Diaz-Orejas, R., Gerdes, K. (1995): Comparison of *ccd* of F, *parDE* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol. Microbiol*, **17**, 211–220

Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R., Konieczny, I. (2002): ParE toxin encoded by the broadhost-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol*, 44, 971–979

Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., Nystrom, T. (2002): Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev*, **16**, 1260–1270

Johnson, E. P., Strom, A. R., Helinski, D. R. (1996): Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. *J. Bacteriol*, **178**, 1420–1429

Kallipolitis, B. H., P. Valentin-Hansen. (2004): A role for the interdomain linker region of the *Escherichia coli* CytR regulator in repression complexformation. *J. Mol. Biol*, **342**, 1–7

Kamada, K., Hanaoka, F., Burley, S. K. (2003): Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote–toxin recognition. *Mol. Cell*, **11**, 875–884

Kiss G. B., Dobo K., Dusha I., Breznovits A., Orosz L., Vincze E., Kondorosi A. (1980): Isolation and characterization of an R-prime plasmid from *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 141, 121-128

Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., Engelberg-Kulka, H. (2007): A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science*, **318**, 652

Kondorosi Á., Kiss G., Forrai T., Vince É., Bánfalvi Z. (1977): Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature*, 268 525-527

Kondorosi A., Orosz L., Svab Z., Sik T. (1974): Genetic studies on rhizobiophage 16-3. II. Helper-induced transfection. *Mol Gen Genet*, **132**, 153-163

Korch, S. B., Henderson, T. A., Hill, T. M. (2003): Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol*, **50**, 1199–1213

Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, T., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H. (1999): Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 14264–14269

Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kornberg, A. (2001): Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli. Science*, **293**, 705–708

Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., Kornberg, A. (1997): Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, **272**, 21240–21243

Laurie, A. D., Bernardo, L. M., Sze, C. C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nyström, T., Shingler, V. (2003): The role of the alarmone (p)ppGpp in σN competition for core RNA polymerase. *J. Biol. Chem*, 278, 1494–1503

Lehnherr, H., Yarmolinsky, M. B. (1995): Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 3274–3277

Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., Yarmolinsky, M. B. (1993): Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: *doc*, which causes cell death on curing of prophage, and *phd*, which prevents host death when prophage is retained. *J. Mol. Biol*, **233**, 414–428

Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685

Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C., Diaz-Orejas, R. (2004): Identification of residues of the kid toxin involved in autoregulation of the parD system. *J. Bacteriol*, **186**, 240–243

Magnuson, R., Yarmolinsky, M. B. (1998): Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. J. Bacteriol, 180, 6342–6351

Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T., Horiuchi, T. (1992): Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *J. Biol. Chem*, **267**, 12244–12251

Mandel M., Higa A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol, 53, 159-162

Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (2001): The regulation of the *Escherichia coli mazEF* promoter involves an unusual alternating palindrome. *J. Biol. Chem*, **276**, 5975–5984

Masuda, Y., Ohtsubo, E. (1994): Mapping and disruption of the *chpB* locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, **176**, 5861–5863

Masuda, Y., Miyakawa, K., Nishimura, Y., Ohtsubo, E. (1993): *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J. Bacteriol*, **175**, 6850–6856

McKay D.B, Steitz T. A. (1981): Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 A resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature*, **290**, 744-9

Meinhart, A., Alonso, J. C., Strater, N., Saenger, W. (2003): Crystal structure of the plasmid maintenance system ε/ζ : functional mechanism of toxin ζ and inactivation by $\varepsilon 2 \zeta 2$ complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 1661–1666

Metzger, S., Dror, I.B., Aizenmann, E., Schreiber, G., Toone, M., Friesen, J.D., Cashel, M., Glaser, G. (1988): The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, **263**, 15699–15704

Miller, J. H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor

Mittenhuber, G. (1999): Occurrence of *mazEF*-like antitoxin/toxin systems in bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 1, 295–302

Murray, K. D., Bremer, H. (1996): Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli. J. Mol. Biol*, **259**, 41–57

Naito, T., Kusano, K., Kobayashi, I. (1995): Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science*, 267, 897–899

Ogura, T., Hiraga, S. (1983): Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **80**, 4784–4788

Olasz F., Dorgai L., Papp P., Kósa E., Orosz L. (1985): On the site-specific recombination of phage *16-3* of *Rhizobium meliloti*: identification of genetic elements and att recombinations. *Mol Gen Genet*, **201**, 289-295

Ördögh F., Szende K. (1961): Temperate bacteriophages isolated from *Rhizobium meliloti*. Acta Microbiol Acad Sci Hung, **8**, 65-71

Orosz L. (1980): Methods for analysis of the C cistron of temperate phage *16-3* of *Rhizobium meliloti. Genetics*, **94**, 265-276. p.

Orosz L., Sik T. (1970): Genetic mapping of rhizobiophage *16-3. Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 17, 185-194

Orosz L., Pay A., Dallmann G. (1980): Heterozygosis of phage *16-3* of *Rhizobium meliloti*: moderate level of mismatch repair or gene conversion. *Mol Gen Genet*, **179**, 163-167

Orosz L., Svab Z., Kondorosi A., Sik T. (1973): Genetic studies on rhizobiophage 16-3. I. Genes and functions on the chromosome. *Mol Gen Genet*, **125**, 341-350

Pabo C. O., Lewis M. (1982): The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature*, **298**, 443-7

Pabo C. O., Sauer R. T. (1984): Protein-DNA recognition. Annu Rev Biochem, 53:293-321.

Pandey, D. P., Gerdes, K. (2005): Toxin–antitoxin quality control loci are highly abundant in freeliving but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, **33**, 966–976 Papp I., Dorgai L., Papp P., Jonas E., Olasz F., Orosz L. (1993): The bacterial attachment site of the temperate *Rhizobium* phage *16-3* overlaps the 3' end of a putative proline tRNA gene. *Mol Gen Genet*, **240**, 258-264

Papp P. P., Iyer V. N. (1995): Determination of the binding sites of RepA, a replication initiator protein of the basic replicon of the IncN group plasmid pCU1. *J Mol Biol*, **246**, 595-608

Papp P. P., Nagy T., Ferenczi S., Elo P., Csiszovszki Z., Buzas Z., Patthy A., Orosz L. (2002): Binding sites of different geometries for the 16-3 phage repressor. Proc Natl Acad Sci USA, 99, 8790-8795

Papp PP, Elö P, Semsey S, Orosz L. (2000): Footprinting studies of specific complexes formed by RepA, a replication initiator of plasmid pCU1, and its binding site. *J Bacteriol*, **18**, 5409-15.

Pecota, D. C., Kim, C. S., Wu, K., Gerdes, K., Wood, T. K. (1997): Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Appl. Environ. Microbiol*, 63, 1917–1924

Pedersen, H., P. Valentin-Hansen. (1997): Protein-induced fit: the CRP activator protein changes sequence-specific DNA recognition by the CytR repressor, a highly flexible LacI member. *EMBO J*, **16**, 2108–2118

Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., Ehrenberg, M. (2003): The bacterial toxin RelE displays codonspecific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, **112**, 131–140

Pedersen, K., Christensen, S. K., Gerdes, K. (2002): Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol*, **45**, 501–510

Pullinger, G. D., Lax, A. J. (1992): A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrientlimited conditions. *Mol. Microbiol*, **6**, 1631–1643

Roberts, R. C., Spangler, C., Helinski, D. R. (1993): Characteristics and significance of DNA binding activity of plasmid stabilization protein ParD from the broad host-range plasmid RK2. *J. Biol. Chem.* **268**, 27109–27117

Roberts, R. C., Strom, A. R., Helinski, D. R. (1994): The *parDE* operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss. *J. Mol. Biol*, **237**, 35–51

Sambrook J., Fritisch E. F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467 Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C., Giraldo, R., Diaz-Orejas, R. (2002): Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the parD killer system of plasmid R1. *FEMS Microbiol. Lett*, **206**, 115–119

Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., Engelberg-Kulka, H. (2001): Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger *mazEF* lethality. *J. Bacteriol*, 183, 2041–2045

Sat, B., Reches, M., Engelberg-Kulka, H. (2003): The *Escherichia coli mazEF* suicide module mediates thymineless death. *J. Bacteriol*, **185**, 1803–1807

Sayeed, S., Reaves, L., Radnedge, L., Austin, S. (2000): The stability region of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri* encodes an efficient postsegregational killing system. *J. Bacteriol*, **182**, 2416–2421

Semsey S., Blaha B., Koles K., Orosz L., Papp P. P. (2002): Site-specific integrative elements of rhizobiophage *16-3* can integrate into proline tRNA (CGG) genes in different bacterial genera. *J Bacteriol*, **184**, 177-182

Semsey S., Papp I., Buzas Z., Patthy A., Orosz L., Papp P. P. (1999): Identification of sitespecific recombination genes *int* and *xis* of the *Rhizobium* temperate phage *16-3*. *J Bacteriol*, **181**, 4185-4192

Shearwin, K. E., I. B. Dodd, J. B. Egan. (2002): The helix-turn-helix motif of the coliphage *186* immunity repressor binds to two distinct recognition sequences. *J. Biol. Chem*, **277**, 3186–3194

Sia, E. A., Roberts, R. C., Easter, C., Helinski, D. R., Figurski, D. H. (1995): Different relative importances of the *par* operons and the effect of conjugal transfer on the maintenance of intact promiscuous plasmid RK2. *J. Bacteriol*, **177**, 2789–2797

Sík T., Orosz L. (1971): Chemistry and genetics of *Rhizobium meliloti* phage 16-3. *Plant and Soil* spec vol, 57-62

Simons, R. W., Houman, F., Kleckner, N. (1987): Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85–96.

Smith, A. S., Rawlings, D. E. (1997): The poison–antidote stability system of the broad-host-range *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid pTF-FC2. *Mol. Microbiol*, **26**, 961–970

Smith, J. A., Magnuson, R. D. (2004): Modular organization of the Phd repressor/antitoxin protein. *J. Bacteriol*, **186**, 2692–2698

Sobecky, P. A., Easter, C. L., Bear, P. D., Helinski, D. R. (1996): Characterization of the stable maintenance properties of the *par* region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol*, **178**, 2086–2093

Sváb Z., Kondorosi Á., Orosz L. (1978): Specialized transduction of a cystein marker by *Rhizobium melilot*i phage *16-3*. *J Gen Microbiol*, **106**, 321-327

Szende K. (1971): Genom structures in a lysogenic *Rhizobium meliloti* system. *Plant and Soil spec vol*, 81-84

Szende K., Ördögh F. (1960): Die lysogenie von Rhizobium meliloti. Naturwissenschaften, 47 404-405

Thatte, V., D. E. Bradley, V. N. Iyer. (1985): N conjugative transfer system of plasmid pCU1. *J. Bacteriol*, 163, 1229–1236.

Tian, Q. B., Ohnishi, M., Tabuchi, A., Terawaki, Y. (1996): A new plasmid-encoded proteic killer gene system: cloning, sequencing, and analyzing hig locus of plasmid Rts1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **220**, 280–284

Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1988): Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J. Bacteriol*, **170**, 1461–1466

van Melderen, L., Bernard, P., Couturier, M. (1994): Lon dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol. Microbiol*, **11**, 1151–1157

Vaughn, J. L., Feher, V., Naylor, S., Strauch, M. A., Cavanagh, J. (2000): Novel DNA binding domain and genetic regulation model of *Bacillus subtilis* transition state regulator *abrB. Nature Struct. Biol*, 7, 1139–1146

Wharton, R. P., M. Ptashne. (1987): A new-specificity mutant of 434 repressor that defines an amino acid-base pair contact. *Nature*, **326**, 888–891.

Youderian, P., A. Vershon, S. Bouvier, R. Sauer, M. Susskind. (1983): Changing the DNAbinding specificity of a repressor. *Cell*, **35**, 777–783

Zhang, J., Zhang, Y., Inouye, M. (2003): Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, **278**, 32300–32306

Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., Inouye, M. (2003): MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell*, **12**, 913–923

Zhang, Y., Zhang, J., Hara, H., Kato, I., Inouye, M. (2005): Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J. Biol. Chem*, **280**, 3143–3150

M2.

16-3 fág c gén nukleotidsorrendje

35641	agtcaacaag	caattgtcgc	tgacccggca	cgctaccaat	attttccggc	gagaatgata	
35701	ggatgcacgc	tcacaacttg	ttcgcgcgtg	aattcaatct	tcttcgtcgg	attgtactgc	
35761	tgcagcacga	gcttgttggc	ggtccagccg	acgaattcct	tgacgaatcc	gcggggaggg	
35821	gcgccgtcat	cctcgttgtc	ggggtgtatc	tgaataacca	catcatcacc	gcggcgcggc	
35881	ggtttggtag	ggtgaaccca	gacggtctcg	cctggtcgga	agcgcggcac	cattgattcg	
35941	ccgtcgatat	agacagcgta	cgcgttcggc	acattctcga	gcgatggcgg	gcagtcgacg	
36001	taatccaaaa	ccgacccgtt	gaagatgtac	tctccgtctt	ctccgcccac	ggcttccccc	
36061	agtactggta	acaatttctt	cttgcgcggc	tccatgttgg	tttcttcgcc	gatcgtggcg	
36121	ttcggtcgag	gcaggtgctc	ctgctgcctt	atgatgggga	acggctcgcg	gggtgacggc	
36181	agcacagccc	tgtacttccg	cagacccgcc	agagacgtca	ccttctccgg	atcccggcca	
36241	gcttcggtca	tcatttggcg	catctcctgc	tcgtcgatcc	caagctcgcg	cgcaagctcg	
36301	cgccaaacca	ttgacgacgc	cgcacggccc	gcaaataggt	tgttgatcgc	ctgttggctt	
36361	tgaccaacgc	gccgtgcgag	ttcggcttgc	gtgattcctg	cctcttccag	cttcgcggcc	
36421	agagtgtetg ttaategget catgtgaaat gteeetttat geateaacaa ettataeeat						

M3.

16-3 fág C represszor aminosavsorrendje

MHKGTFHMSRLTDTLAAKLEEAGITQAELARRVGQSQQAINNLFAGRAASSMVWRELAR ELGIDEQEMRQMMTEAGRDPEKVTSLAGLRKYRAVLPSPREPFPIIRQQEHLPRPNATIGEE TNMEPRKKKLLPVLGEAVGGEDGEYIFNGSVLDYVDCPPSLENVPNAYAVYIDGESMVPR FRPGETVWVHPTKPPRRGDDVVIQIHPDNEDDGAPPRGFVKEFVGWTANKLVLQQYNPTK KIEFTREQVVSVHPIILAGKYW

M4.

A. tumefaciens pemI nukleotidsorrendje

1	atgaccgtga	ccacgaaaat	aagacgccag	ggcggcgcgg	cggtgatgac	gatcccgccc
61	gctcttttga	agatgctggg	gctggaaatc	ggtgagcaac	tgacgctcga	ggtcgataat
121	ggcgctctgg	tggcaagccc	ggttcgactg	gaaaagaaac	gcttcacgct	ggccgaatta
181	ctggatggtg	cagaggaagt	ggcagctcta	aacgccaggg	agcgggcgtg	ggacacagcg
241	cctcctgtcg	gcaaagaagc	gttgtga			

M5.

A. tumefaciens pemK nukleotidsorrendje

```
1 atggtccgca accagatccc caagcgcggc gacgtttatc tggttgatct aaaccctgtc
61 gtaggcagcg aaatcaagga cgaacatcgc tgtgtcgtca tcacgcccag agaaattaac
121 gcggtcggac tctgtctcgt cgtcccggtg accaccggcg gcatgtttac gcgcaaggca
181 gggcttgccg taaatatatc cggccacaag acaacgggcg tcgctttgtg caatcaggtg
241 agaagcatgg atatcgtcgc ccgggttgcc cagaagaaag cgaaatatat cgaaacctc
301 gatgatgcga cgatcgatga aatcgccggg cgcgtcatca gcatgatcga tccagcttga
```

M6

A dolgozat témakörében megjelent publikációk

IF, SCI folyóiratbeli cikkek

Ferenczi S, Orosz L, Papp PP. (2006): Repressor of phage *16-3* with altered binding specificity indicates spatial differences in repressor-operator complexes. *J Bacteriol*, **188** (4), 1663-6 **IF: 4,146**

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

<u>IF: 4,054</u>

Blaha B, Semsey S, **Ferenczi S**, Csiszovszki Z, Papp PP, Orosz L. (2004): A proline tRNA(CGG) gene encompassing the attachment site of temperate phage *16-3* is functional and convertible to suppressor tRNA. *Mol Microbiol*, **54** (3), 742-54. **IF: 5,959**

Ferenczi S, Ganyu A, Blaha B, Semsey S, Nagy T, Csiszovszki Z, Orosz L, Papp PP. (2004): Integrative plasmid vector for constructing single-copy reporter systems to study gene regulation in *Rhizobium meliloti* and related species. *Plasmid*, **52** (1), 57-62. **IF: 1,542**

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

<u>IF: 10,452</u>

Konferencia kiadvány (proceeding): Nemzetközi

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

Előadás, poszter bemutatás Nemzetközi

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

Magyar

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

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek **Dr. Orosz László** professzor úrnak, aki minden lehetőséget, szakmai támogatást, szemléletbeli iránymutatást megadott e téma kivitelezésére és mindig szabad kezet engedett ötleteink megvalósításához. Köszönet illeti **Dr. Papp Pétert**, aki a kísérletek gyakorlati kivitelezésében és az eredmények helyes értelmezésében adott nélkülözhetetlen tanácsokat.

Hasonlóképpen köszönöm kollégáimnak **Dr. Semsey Szabolcsnak**, **Dr. Buzás Zsuzsannának**, **Dr. Blaha Bélának**, **Dr. Ganyu Anitának**, **Bodogai Mónikának** és **Dr. Csiszovszki Zsoltnak** a kísérletekben nyújtott önzetlen segítségükért, szakmai tanácsaikért.

Köszönöm Gálné Szóráth Kornéliának, Péliné Tóth Magdolnának, Maszlag Editnek és Törökné Sánta Csillának az általuk nyújtott magas szintű, tökéletes asszisztenciát.

Végezetül köszönöm az egész Családomnak a nyugodt hátteret.