

A MegacinA-termelés plazmid kódoltságának bizonyítása

*Bacillus megaterium*ban

Doktori dolgozat

Rostás Katalin

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

1980.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatom alapjául szolgáló kísérleteket az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Mikrobiális Genetika csoportjában végeztem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Alföldi Lajosnak, aki lehetővé tette számomra, hogy csoportjában dolgozzam és irányította munkámat.

Dr. Koncz Csabának tanácsaiért, a biokémiai módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért és a restriktív enzimek rendelkezésemre bocsátásáért mondok köszönetet.

Köszönöm Fodor Katalin baráti segítségét, s a protoplaszt transzformációs kísérletekben való közreműködését. Hálás vagyok Dr. Udvardy Andornak, aki hibridizációs kísérleteimhez a DNS minták izotóp jelölését elvégezte.

Munkám elősegítéséért, támogatásáért a csoport egész kollektívájának köszönettel tartozom.



## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                                      | Oldal |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| RÖVIDÍTÉSEK                                                                                                          |       |
| 1. BEVEZETÉS .....                                                                                                   | 1.    |
| 1.1. A bakteriocinogénia .....                                                                                       | 2.    |
| 1.2. Gram pozitív baktériumok bakteriocin<br>termelése .....                                                         | 6.    |
| 1.3. A Bacillus megaterium bakteriocinjai ..                                                                         | 7.    |
| 1.4. A megacinaA termelő Bacillus megaterium<br>törzsek izolálása .....                                              | 9.    |
| 1.5. A megacinaA indukciója .....                                                                                    | 11.   |
| 1.6. A megacinaA hatása protoplasztokra .....                                                                        | 12.   |
| 1.7. A megacinaA azonos a foszfolipázA<br>enzimmel .....                                                             | 12.   |
| 1.8. A megacिनogénia genetikai determiná-<br>ciója .....                                                             | 14.   |
| 1.9. A B.megaterium 216 és 58 törzseinek<br>extrakromoszómális DNS-e .....                                           | 15.   |
| 1.10. Genetikai átviteli módok B.megaterium<br>törzsek között: protoplasztfúzió,<br>protoplaszt transzformáció ..... | 17.   |
| 2. CÉLKITÜZÉSEK .....                                                                                                | 22.   |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....                                                                                        | 25.   |
| 3.1. Táptalajok .....                                                                                                | 26.   |
| 3.2. Baktérium tenyésztés .....                                                                                      | 27.   |



|                                                                                       | Oldal |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.3. Protoplasztpreparálás .....                                                      | 28.   |
| 3.4. Protoplasztfúzió .....                                                           | 28.   |
| 3.5. Protoplaszt regeneráció .....                                                    | 29.   |
| 3.6. Protoplaszt transzformáció plazmid<br>DNS-sel .....                              | 29.   |
| 3.7. Gélelektroforézis .....                                                          | 30.   |
| 3.8. CsCl-EtBr egyensúlyi sűrűségi grádiens<br>centrifugálás .....                    | 30.   |
| 3.9. Restrikciós endonukleáz reakciók .....                                           | 31.   |
| 3.10. A fúziós utódok tesztelése .....                                                | 31.   |
| 3.11. Plazmid DNS-ek filter hibridizációja ....                                       | 33.   |
| 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK .....                                                   | 35.   |
| 4.1. Törzskonstrukció .....                                                           | 35.   |
| 4.2. A tulajdonságok stabilitása .....                                                | 36.   |
| 4.3. A B.megaterium AF100 törzs és származékai<br>plazmidtartalmának kimutatása ..... | 38.   |
| 4.4. AF216 totál plazmid DNS-sel történő<br>protoplaszt transzformáció .....          | 43.   |
| 4.5. Az AF216 törzs megacinaA termelést kódoló<br>plazmidjának kiválasztása .....     | 45.   |
| 5. ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                | 51.   |
| 6. IRODALOMJEGYZÉK .....                                                              | 53.   |

## RÖVIDÍTÉSEK

|          |                                    |
|----------|------------------------------------|
| AO       | : Akridin Orange                   |
| EDTA     | : Etilén-Diamin-Tetraecetsav       |
| EtBr     | : Ethidium-Bromid                  |
| Tris     | : tris-/hidroxi-metil/-amino-metán |
| megA     | : megacinA                         |
| Str      | : Streptomycin                     |
| Trim     | : trimetoprim                      |
| PEG      | : Polietilén-Glikoll               |
| HPUra    | : 6-/p-hydroxy-phenylazo/-uracil/  |
| F faktor | : Fertilitási faktor               |
| R faktor | : Rezisztencia faktor              |
| D        | : Dalton                           |

## 1. BEVEZETÉS

Dolgozatom egy tulajdonság plazmid kódoltságának bizonyításáról szól. A tulajdonság egy Bacillus megaterium törzs bakteriocin termelő képessége - s mind ez, mind a baktérium maga - évtizedek óta kutatások tárgya.

Az irodalmi bevezetőben e kutatások két olyan területét szeretném ismertetni, amelyen szinte kizárólag csak szegedi kutatók dolgoztak, s teljes kísérleti rendszerek kifejlesztése után eredményeiket az irodalomban először publikálták :

Ivanovics és Alföldi, 1954, Nature; Fodor és Alföldi, 1976, PNAS.

Mindkét közlemény a Gram pozitív Bacillus megateriumra vonatkozik. A korábbiak bizonyos törzsek bakteriocin termelő képességét irták le, a későbbi közlemény pedig a sikeres bakteriális protoplasztfuziót tartalmazza, amely lehetőséget nyújtott e baktérium genetikájának tanulmányozására.

Nagyon örültem volna, ha dolgozatom egyik opponense Ivanovics György professzor lehetett volna. Sajnálatomra hosszú betegsége után 1980 szeptemberében bekövetkezett halála ezt megheiusította. Munkámat az emlékének ajánlom.

### 1.1. A bakteriocinogénia

A bakteriocinogénia bizonyos baktériumtörzseknek azt a tulajdonságát jelöli, hogy képesek olyan fehérjemolekulákat szintetizálni, amelyek az érzékeny baktérium tenyészeteket előlik. A fehérjék - bakteriocinek - szintézise letális a termelő törzsrre, de a termelő törzs legtöbbször rezisztens a külsőleg adott saját termékre. A bakteriocinek antibiotikus hatás-spektruma nagyon szűk, rendszerint az azonos faj különböző törzseit, illetve néhány szoros rokonságban lévő fajt foglal magában.

A bakteriocinogénia főleg a Valódi baktériumok körében elterjedt jelenség. Azonban ezen ordo szinte minden speciesében található olyan törzs, amely egy vagy több antibakteriális fehérjét termel. A legtöbbet tanulmányozott bakteriocin csoport az E.coli törzsek által termelt colicin csoport, amely közel 20 már jól jellemzett molekula típust foglal magában. Az első colicint Gratia fedezte fel 1925-ben, s ez a felfedezés ma már egy könyvtárnyi közlemény kísérléteit indította el.

Más baktériumfajok bakteriocinjeiről is egyre több adat áll rendelkezésre, így a bakteriocinogénia jelensége is egyre több szempontból közelíthető meg /21/.

A tipikus bakteriocinek egyik jellemző tulajdonsága az, hogy egyszerű fehérje, vagy fehérje-lipopoliszaharid formában



izolálhatók. A kifejtett hatásért mindig a fehérje rész a felelős. Kivételt képeznek azok a baktérium törzsek, amelyek közvetlen ölő hatásukat baktericid koncentrációju kis molekulájú vegyületek /ammónia, hidrogén-peroxid/ termelésével váltják ki.

A tanulmányozott fehérjék molekulasulya  $3-12 \times 10^4$ D között változik, tulajdonságaik jelentősen eltérnek.

Az érzékeny baktériumok elölését a különböző bakteriocinek igen változatos módon hozzák létre. Első lépésként a bakteriocin molekulák adszorbeálódnak a "megtámadott" baktérium sejtfalán, vagy speciális receptorokhoz kötődnek. Már a sejtbe való bejutás során károsíthatják a sejtmembránt: transzport folyamatainak szétkapcsolásával vagy magának a membrán szerkezetének megbontásával.

A sejtbe jutás után további DNS szintézis gátlással, RNS degradálással, új enzimek indukciójával folytatódhat károsító hatásuk.

Egyféle hatásmechanizmust a colE<sub>3</sub>-CA38 jelű colicin képvisel. A colicin molekulák az érzékeny baktériumok sejtfal receptoraihoz kötődnek, de ez a szakasz még nem vezet sejtpusztuláshoz. Az irreverzibilis hatás a citoplazmában játszódik le: a colicin molekula lehasít 50 nukleotidot a 16S rRNS 3' végéről, így a riboszóma szerkezet megváltoztatásával a fehérjeszintézist gátolja meg. Ezzel a hatásmechanizmussal rendelkezik az *Enterobacter cloacae* cloacin DF13 bakteriocinje is, s a két fehérje aminosav sorrendje is jól megegyezik egymással.

Más hatástípust a colE<sub>2</sub>-P<sub>9</sub> jelű colicin mutat. Általános DNS degradációt okoz, gátolja a sejtosztódást. Ez a hatás DNázok kombinált működésének eredménye. A colicin molekula először egy endonukleáz szintézisét indukálja, amely specifikus vágásokat hoz létre a DNS molekulán. A további DNS emésztést exonukleázok végzik el /21/. Valószínűleg ezzel a mechanizmussal működik a Bacillus megaterium megacinC bakteriocinje is. E baktérium másik bakteriocinje már eltérő hatásmóddal rendelkezik, erről a későbbiekben lesz szó.

Azokban a baktérium törzsekben, ahol ezt kísérletileg vizsgálták, bebizonyosodott, hogy a bakteriocin termelés plazmidok által kódolt. Ebben a vonatkozásban is a legtöbb adat a colicin termelést kódoló plazmidról van: molekulasúlyuk, sokszor fizikai térképük s genetikai átviteli sajátosságai is ismeretesek /8, 18, 21/.

Az először Fredericq által /receptor specificitás alapján/ osztályozott /18/ colicinek colE csoportja kb.  $5 \times 10^6$  D molekulasúlyú plazmidokat foglal magában. A másik jelentős csoport a colI csoport plazmidjai  $62-94 \times 10^6$  D nagyságúak. Mindkét csoportban található olyan plazmid, amely konjugáció során a kromoszóma átviteltől függetlenül átkerülhet a recipiens sejtbe. Főleg a nagyobb méretű colicin plazmidok rekombinálódhatnak R plazmidokkal, s kapcsolatba kerülhetnek a konjugációs rendszerrel is. Egyes plazmidok, mint pl. a colB-CA18, colV-K94 jelűek F-faktor tulajdonságúak: képesek kromoszóma transzfert indítani. A kromoszóma transzfer gyakorisága E.coli törzsekben megegyezik az F-faktorok által indított



átvitelük gyakoriságával.

Hasonlóan, kromoszóma mobilizációs képességű a *Rhizobium leguminosarum* egy törzsének bakteriocint kódoló plazmidja is /24/.

A plazmid molekulák biokémiai módszerekkel történő összehasonlítása, illetve a bakteriocin plazmidok más fertilitásai vagy rezisztencia faktorokkal való interakciójának tanulmányozása lehetőséget nyújt annak demonstrálására, hogy ezek közös eredetűek, s a baktérium törzsek evolúciója során divergáltak ma talán teljesen különböző formákká.

Az azonban csak feltételezés a mai napig, hogy mi volt ez a közös eredet. A két legtöbbet idézett és vitatott elképzelés a "közös őst" defektív profágra, illetve fertilitási faktorra vezeti vissza.

Az első elképzelés szerint a bakteriocin a defektivitás magas szintjére jutott profág terméke, amely szintézis folyamatait jórészt elvesztette, de létrehoz egy vagy több bakteriocin tulajdonságu fehérjét. Alátámasztja ezt az elképzelést az, hogy bizonyos bakteriocinek és bakteriofágok azonos receptorhoz kötődnek a baktérium sejtfalán, illetve egyes bakteriocinek fágfarok és fágfej fehérjék.

A bakteriocinek egy része csak indukció után termelődik, /az indukció DNS szintézis gátló anyagok alkalmazását, UV besugárzást, hőkezelést jelent/ vagyis szintézisük genetikailag szabályozott és normális körülmények között represszált.

Az indukálhatóság nagyon hasonlít a lizogén baktériumok profágjának indukciójához, bár mai ismereteink szerint egyetlen bakteriocin plazmid sem integrálódik tartósan a kromoszómába s tart fenn lizogénia-szerű állapotot.

A bakteriofág eredetnek ellentmondanak a bakteriocin plazmidok tipikusan nem fág tulajdonságai: a DNS molekula nem szintetizál burok fehérjét, s auto-transferabilis lehet, esetenként teljes kromoszóma-átvitelt is indít. Ugyancsak plazmidokra jellemző tulajdonságuk az, hogy kapcsolatba léphetnek R illetve F-faktorokkal, s gyakran monomer formájukon kívül dimer, tetramer formában izolálhatók. A másik érdekes elképzelés a közös eredetre a szűk hatás-spektrum okát is magyarázná. E szerint a bakteriocint kódoló plazmid eredetileg F-faktor volt, s a bakteriocin a konjugációs csatorna funkcióját vesztett, módosult fehérjéje.

A bakteriocinek molekuláris sokfélesége, funkcionális különbözősége azonban nehezé teszi az általánosítást. Lehetséges, hogy nem egyetlen fejlődési vonalat képviselnek, s az analóg hatás mögött különböző genetikai determináció áll.

A bakteriocinek legjobban ismert csoportja az E.coli törzsek által termelt colicin csoport. A Gram pozitív baktériumok körében coccusok /Streptococcus, Staphylococcus/, és Bacillus fajok bakteriocinjeiről áll a legtöbb információ rendelkezésünkre. Ennek részletes jellemzését azonban mellőzöm, mivel munkánkhoz nem kapcsolódik szorosan ez az ismeretanyag.

## 1.2. Gram pozitív baktériumok bakteriocin termelése

A Gram pozitív baktériumok körében jól ismert a Streptococcus törzsek streptocin bakteriocinje. Az elnevezés  $1-10 \times 10^4$  D mólsúlyu fehérjékre vonatkozik, amelyek termelése szintén plazmidok által kódolt /39/.

A *Staphylococcus* törzsek bakteriocinjei /staphylocin/ összetett fehérjék. Plazmidtörlő szerekkel /ETBr, AO/ bakteriocint nem termelő utódok izolálhatók, s egy törzsben Warren és munkatársai egy  $33 \times 10^6$ D mólsúlyu plazmidot azonosítottak, amely egy toxin és a bakteriocin termelésért felelős /50/.

A *Bacillus* genus több speciesében található bakteriocin termelés. A *Bacillus subtilis* bakteriocin kódoló plazmidja hagyományos plazmidtörlő szerek mellett lizozimos protoplasztolással is eliminálható /40/. Az elimináció mechanizmusa még nem ismert, de a jelenség nyilvánvaló különbséget mutat a rendszertanilag közel álló *Bacillus megaterium* egy bakteriocin termelő törzsével /216/, ahol azonos módszerrel plazmid elimináció nem érhető el.

A *Bacillus megaterium*mal ugyancsak "rokon" *Bacillus cereus* törzseiben négy különböző nagyságu bakteriocint kódoló plazmid ismert: a  $pBC_1$   $105 \times 10^6$ D,  $pBC_2$   $13 \times 10^6$ D,  $pBC_3$   $37 \times 10^6$ D és a  $45 \times 10^6$ D mólsúlyu  $pBC_7$  plazmid /1/. A *Bacillus cereus* bakteriocinjei /cerecin/ a *Bacillus megaterium*ra és a *Bacillus thuringiensis*re is hatásosak, s a közeli rokonság bizonyítékeként egyikőjük azonos a *Bacillus megaterium* megacina bakteriocinjével: mindkettő foszfolipázA enzim /41/.

### 1.3. A *Bacillus megaterium* bakteriocinjei

A bakteriocinek egyik csoportját a *Bacillus megaterium* által termelt megacinek képviselik. Mint a bakteriocinek általában, a megacinek is antibakteriális fehérjék, főleg *Bacillus*

megateriumra szorító hatásspecifitásaik.

Ivanovics és munkatársai, valamint B.Holland és munkatársai javaslatára három csoportba oszthatók. Az általános megjelölés Ivanovics és Alföldi 1954-ben megjelent közleményéből származik, ahol az elsőnek leírt megacinA-ra vezették be.

#### A/ MegacinA

A megacinA termelő kolóniák szilárd táptalajon indukció nélkül az érzékeny baktérium pázsiton oldási zónákat hoznak létre. Folyadék tenyészetben spontán indukció után vagy UV besugárzás, mitC kezelés hatására megacinA kerül a tápfolyadékba. Egyedi hatásmechanizmusa a bakteriocinek körében : membrán destrukciót hoz létre mind a termelő, mind az érzékeny baktériumokon.

#### B/ MegacinB

Néhány Bacillus megaterium törzs szilárd táptalajon, s csak igen kis mennyiségben termeli. Folyadéktenyészetben még UV sugárzással sem indukálható. Hatásmechanizmusa még ismeretlen.

#### C/ MegacinC és C<sub>x</sub>

A megacinC és C<sub>x</sub>-et megacinA-t is szintetizáló Bacillus megaterium törzsek termelik. Szilárd és folyadéktenyészetben is igen kis mennyiségben indukció nélkül jelenik meg. Hatásspektruma kissé eltér mind a megacinA, mind a megacinB hatásspektrumától.

Szerológiai vizsgálatok és molekulásúly meghatározások alapján a különböző törzsek által termelt megacinA fehérjék nagyon hasonlónak mutatkoztak. Hatásspektrumuk is kevés kivételtől eltekintve megegyezik, tulajdonképpen egységesnek tekinthetők.

Ezeket a jellemzőket nézve, mind a megacinB, mind a megacinC és  $C_x$  sokkal variabilisabb.

A megacinC és  $C_x$  hatása a molekulasúlybeli és hatásspektrumban való eltérések ellenére is megegyezik.

Holland és munkatársai megállapították, hogy ez a megacin csoport colicin típusu, pontosabban a colE<sub>2</sub> hatásához hasonló, az érzékeny baktérium DNS szintézisét gátolja. A DNS szintézis gátlásával párhuzamosan direkt módon nem gátolja az RNS és fehérje szintézist. Feltételezik, hogy a megacinC egy igen aktiv DNáz szintézisét indukálja, s ennek eredménye a rendkívül gyors DNS destrukció.

A megacinC és  $C_x$  termelés 100%-osan eliminálható magas hőmérsékleten /43°C/ történő rázatással. Valószínű, hogy mindkét fehérje plazmidon kódolt /11/.

Jelen munkában a megacinA termeléssel foglalkozom, a további adatok csak erre az egy bakteriocinre vonatkoznak.

#### 1.4. A megacinA-termelő *Bacillus megaterium* törzsek izolálása

A megacin-termelő *Bacillus megaterium* törzsek eredeti izolálási célja messze állt mindattól, amire a későbbi kísérletekben felhasználták őket. A SZOTE Orvosi Mikrobiológiai Intézetében B<sub>12</sub>-vitamin tultermelő *Bacillus megaterium* törzseket kerestek, s e célból Ivanovicsné, Dr. Krompaszky Sára több száz törzset izolált és tesztelt le. Az izolálási munka során számos törzs lizogénnek mutatkozott. Ezeket a törzseket kiemelték, s a további kísérletekben lizogén állapotuk tanulmányozását Dr. Alföldi Lajos kezdte el. A lizogénia vizsgálata



*Bacillus megaterium* törzseken azért igérkezett különösen érdekesnek, mert Lwoff éppen ezidőben írta le a lizogénia lényegét egy *Bacillus megaterium* törzsön /899/.

A lizogén baktérium tenyészeteket UV sugárzással indukálták, s a kiszabaduló fágreszecskeket fágérzékeny *Bacillus megaterium* tenyészetten titrálták. Az indukció hatására valóban keletkeztek oldási zónák a tesztelő tenyészetten, de innen fágreszecskeket kimutatni nem lehetett. A további kísérletek során kiderült, hogy az indukálódott anyag kevés kivétellel csak más *B. megaterium* törzsekre hatásos, így arra következtettek, hogy ez az anyag egy bakteriocin, s a már ismert colicin és pyocin mintájára megacinnek nevezték el /Ivanovics és Alföldi, 1954/.

A későbbiekben az is kiderült, hogy többféle megacin létezik, de ezekben a kísérletekben főleg a legnagyobb mennyiségben termelődő, s egyedül indukálható megacinA-t észlelték. A többi megacin /B, C, C<sub>x</sub>/ kimutatása speciális körülményeket igényel, így itt a megacinra vonatkozó megfigyelések megacinA-ra értendők. A törzs izolálás levegő, talaj, ürülék mintákból történt. Az összes izolátum egyharmada volt megacin-termelő.

A megacinogén baktériumok fágokkal fertőzhetőek, s lizogénizálhatóak is. Indukció után mindkét tulajdonság repressziója megszűnik, s a baktériumok pusztulását megacin és fág együttes lizise hozza létre.

A megacin hatásspektruma főleg *B. megaterium* törzseket foglal magában, de szintén hatásos néhány *B. subtilis*, *B. anthracis* s egy pár pigmentképző *Micrococcus* törzsre is.

### 1.5. A megacinA indukciója

A megacinA indukciójára vonatkozó részletes kísérleteket Ivanovics és Alföldi végezte el. Megállapították, hogy a tenyésztés körülményeitől nagy mértékben függ, s teljes indukció csak gazdag tápfolyadékban való tenyésztés után érhető el.

Az indukciót a következő módon hajtották végre :

A gazdag tápfolyadékban előnövesztett logaritmikus baktérium tenyészetet kis, 2-3 mm-es rétegvastagságban besugározták alacsony UV dózissal. Ezután vagy egyszerűen továbbfolytatták a tenyésztést, vagy friss tápfolyadékba oltották az indukált tenyészet kisebb részletét. A tenyészet mikrobiológiai jellemzőit követve a következő eredményt kapták :

- a/ Az UV indukciót követő 90.percről kezdve a tenyészet denzitása csökken.
- b/ A sejtszám szintén csökken.
- c/ A telepképző baktériumok száma a tenyészetben már a 90. perc előtt is drasztikusan esik.

A denzitás-csökkenést a sejtszám csökkenése azonban nem arányosan követi, ami azt a feltételezést szülte, hogy ez az intracelluláris anyagok tápfolyadékba jutásának az eredménye, vagyis a megacinA az ozmotikus viszonyokat változtatja meg. Erre utalnak a tenyészetben az indukciót követő morfológiai változások is. Az első látható elváltozás a láncképzés redukciója, majd nagy elongálódott bacillus formák jelennek meg.

60 perccel az UV kezelés után már sok az abnormális sejtforma, amelyekben vakuolumok képződnek, s végül a sejt kiürül. Az indukció irreverzibilis, a 90. perc után totál, 97-99%-os lizis

következik be. A megacinaA letális bioszintézise tehát kb.:  
90 percig tart.

#### 1.6. A megacinaA hatása protoplasztokra

Az indukció után szintetizált anyag megváltoztatja a sejtek ozmotikus állapotát irreverzibilisen, s ez az állapotváltozás lizishez vezet. Ivanovics és munkatársai többek között protoplaszt preparátumokon tanulmányozták a megacinaA hatásának módját.

A B.megaterium KM törzs baktérium tenyészetét protoplaszt szuszpenzióvá alakították, s a preparátum optikai denzitását, mikrobiológiai jellemzőinek változását mérték különböző koncentrációju megacinaA jelenlétében, az idő függvényében. Párhuzamosan mikroszkóposan is megfigyelték a protoplasztok állapotváltozását, s azt tapasztalták, hogy a megacinaA már az optikai denzitás csökkenése előtt elkezdte azt a deformáló hatást, amely a protoplasztokat "ghostlike" képződményekké alakítja.

Az optikai denzitás hirtelen csökkenéséből és a protoplasztok jellegzetes gömb formájának eltorzulásából arra következtettek, hogy a megacinaA a sejtmembránra hat, s a membrán szerkezetében bekövetkező változások miatt szűnik meg a sejt ozmotikus védettsége.

#### 1.7. A megacinaA azonos a foszfolipáza enzimmal

Már a megacinaA indukciójával foglalkozó közleményekben leírták, hogy ez a diffuzibilis, indukció után szintetizálódó

anyag fehérje természetű, s feltételezhetően enzim /Ivanovics és mtsai, 1957/.

Érzékeny sejteket megacinaA termelő tenyészet tápfolyadékával kezelték normál és alacsony hőmérsékleten. Míg a normál hőmérsékleten folytatott inkubáció teljes megacin hatást eredményezett, alacsony hőmérsékleten a ható molekula elvesztette aktivitását.

Nagy E. és munkatársai részlegesen tisztított megacinaA preparátum hőstabilitását, proteolitikus érzékenységet vizsgálták, s megállapították, hogy az anyag hőérzékeny s fehérjebontó enzimekkel emészthető. A megacinaA fehérje részletes jellemzését B.Holland végezte el.

A homogenitásig tisztított megacinaA egyszerű fehérje, mólsúlya kb. 50 000. Elektroforetikus mobilitása, aminosav összetétele alapján /az összaminosav 30%-a Asp és Gln/ savas tulajdonságú. Hővel és 7 M ureával denaturálható, kimotripszin nem, pepszin és tripszin gyengén emészt. Nemcsak hőlabilitása, de a membránon kifejtett hatása is a megacinaA enzim jellegére utalt. A foszfolipázA enzimmel való azonosítását japán kutatók /41/ végezték el. Összehasonlították a homogenitásig tisztított megacinaA fehérje és a foszfolipázA enzim hemolitikus aktivitását, s lecitin emésztési képességét. Immunprecipitációs vizsgálatokkal megállapították, hogy a megacinaA preparátumban egyetlen fehérje felelős a lipidbontó és a megacinaA aktivitásért. Ezek szerint a megacinaA azonos a foszfolipázA enzimmel.

### 1.8. A megacinogénia genetikai determinációja

A megacin-termelő törzsek izolálása idején a *B. megaterium* törzsek között semmilyen genetikai átviteli forma sem volt ismert. A termelő törzsek friss izolátumok voltak, zömében sporogén és prototróf tulajdonságuk. Genetikai vizsgálatra alkalmas rendszer híján a megacinogénia determinációjára csak feltételezéseket tettek.

Igy, Ivanovics és munkatársai a megacin indukció és a lizogén baktériumok profág indukciója közötti hasonlóság alapján a megacin termelést bakteriofág által kódolt tulajdonságnak vélte. A későbbi kísérletek során azonban a sejtlizátumban sem érett fágot, sem defektivitásra utaló fágdarabot sem tudtak kimutatni. A megacin-termelő képesség tesztelésekor az is kiderült, hogy ez nem stabil tulajdonság, nem termelő baktériumok ezrelékes gyakorisággal szegregálnak egy termelő tenyészetben. Mivel ez a labilitás plazmidokra jellemző, felvetették, hogy a megacinogénia plazmidkódolt tulajdonság lehet.

Ebből a feltételezésből indultak ki azok az amerikai kutatók is /Carlton, Helinski, Hennebery, Smith és Brown/, akik a Gram pozitív bacillusok cirkuláris DNS-ének tanulmányozására a *B. megaterium* 216 megacin-termelő és a *B. megaterium* 58 megacin szenzitív törzsét választották.

Már az első kísérletek rendkívül érdekes eredményt hoztak. Mindkét törzs össz-DNS-ének jelentős része extrakromoszómális DNS-nek bizonyult, s EM\* vizsgálatok alapján e molekulák mérete heterogénnek tűnt. A továbbiakban e heterogén cirkuláris molekulák jellemzését, eredetük tisztázását kívánták elvégezni, s

\*  
EM = elektronmikroszkópos

természetesen annak eldöntését, hogy van-e olyan extrakromoszómális DNS molekula, amely a megacin determinációjáért felelős.

#### 1.9. A B. megaterium 216 és 58 törzseinek extrakromoszómális DNS-e

Az amerikai kutatók közleményei alapján a B.megaterium e két törzse komplex plazmid rendszerrel rendelkezik. E rendszer legfőbb jellemzője az, hogy nagyon különböző molekula osztályok több száz kópiában vannak jelen sejtenként, de eredetük, funkciójuk, regulációjuk még nem ismert /3/.

A B.megaterium 216 törzs össz-DNS-ének 15-40%-a bizonyult extrakromoszómális DNS-nek. Elektronmikroszkópos mérések alapján a molekulák mólsúlyát a következőképpen határozták meg : mind a B.megaterium 216, mind az 58 törzs tíz különböző méretű molekulát tartalmaz. Legnagyobb mennyiségben a 3.9, 6.2, 16, 31.0, 60.0 MD mólsúlyuk vannak jelen, s kisebb mennyiségben a 7.6, 11.7, 47.0, 89.0, 112.0 MD nagyságuk találhatók /23/. Különböző fiziológiai körülmények között felnövesztett baktérium tenyészetekben a preparálható extrakromoszómális DNS mennyisége változó volt, de az öt legnagyobb mennyiségben jelenlévő osztály aránya állandó.

Carlton egy specifikusan Gram pozitív baktériumra ható DNS szintézis gátló pirimidin analóg hatását vizsgálta a B.megaterium 216 törzsben /5/. Eredményei szerint a HPURa a kromoszómális és a nagy molekulásúlyú plazmid DNS-ek replikációját jelentősen gátolja, míg ez a hatás nem érvényesül

a két legkisebb /3.9, 6.2 MD/ plazmid replikációjára. Feltételezi, hogy legalább két regulációs rendszer működik a *B.megaterium* 216 törzsben, amely a különböző méretű molekulák kópia számát szabályozza. A két kis plazmid eltérő regulációjára utal az is, hogy ez a két plazmid teszi ki az extrakromoszómális DNS 75%-át /600 kópia/sejt/.

Ugyancsak Carlton és Brown /6/ elvégezték a 3.9 MD mólsúlyu plazmid restrikciós endonukleázokkal történő fizikai térképezését. A térképet hét enzim egyes és kettős emésztésével nyert adatokból állították össze. Adataik szerint a plazmid DNS-nek nincsenek variálódó szakaszai, szekvenciája konzervatív.

Sokkal bizonytalanabb a helyzet a nagyobb mólsúlyu molekulákkal. Hennebery és Carlton 1973-ban megjelent cikküket azzal a bevezetővel kezdik, hogy a *B.megaterium* cirkuláris DNS-e nem tipikus bakteriális plazmid DNS. Összehasonlították a cirkuláris és kromoszómális DNS hődenaturációs-renaturációs kinetikáját és megállapították, hogy mindkét DNS tipikus bakteriális DNS módjára reasszociál. A cirkuláris DNS-nek nincs gyorsan renaturáló frakciója, amely a plazmidokra jellemző repetitív szekvenciák jelenlétére utalna.

DNS-DNS hibridizációs kísérletekben kimutatták, hogy a cirkuláris és a kromoszómális DNS között nagymértékű /65-80%/ szekvencia homológia van. Elképzelhetőnek tartották, hogy az extrakromoszómális DNS molekulák kromoszóma darabok kivágódásával, s recirkularizációjával jönnek létre. Az izolált plazmid molekulák egymáshoz való hibridizációja azt mutatta, hogy a molekulák zömén azonos szekvenciájú szakaszok vannak,

s ezeket a kromoszómális DNS is tartalmazza. Vagyis, a különböző méretű molekulák szekvenciája nem egyedi. A molekulasúlyok alapján feltételezhető, hogy bizonyos molekulák tetramer vagy dimer formái egy alapmolekulának /pl. 3.9 MD és 16 MD/. Restrikciós endonukleázokkal végzett emésztés azonban nem eredményezett azonos fragmentumokat.

A megacिनogénia plazmid kódoltságára sem derült fény. Valószínűleg azért, mert mindkét vizsgált törzs komplikált extra-kromoszómális DNS-sel rendelkezik, s a tulajdonság genetikai átvitele, vizsgálata sem volt még megoldható.

1.10. Genetikai átviteli módok *Bacillus megaterium* törzsek között : protoplasztfúzió, protoplaszt transzformáció

A protoplasztok mikroorganizmusok, illetve növényi sejtek sejtfaltól megszabadított, kettős membránnal körülvett, gömbalaku formái. A protoplasztok membránjai megfelelő kezelés hatására /magas  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció, pH változás, s leg hatásosabban PEG adására/ összeolvadnak, s a citoplazmák összekeverednek. Ezt a folyamatot nevezzük protoplaszt fúciónak.

A protoplaszt fúzió széleskörű alkalmazása genetikai vizsgálatokhoz a növényi protoplasztok PEG-indukálta fúziójának leírásával kezdődött /Kao és Michayluk, 1974/. 1975-ben gomba protoplasztok PEG-indukálta fúzióját szegedi kutatók közölték /Ferenczy, Kevei és Szegedi/. A technika alkalmaznak bizonyult Gram pozitív baktériumok protoplasztjainak fuzionáltatásához is /*B. subtilis*: Schaeffer, Cami és Hotchkiss, 1976; *B. megaterium*: Fodor és Alföldi, 1976/ /17/.



Sugárgombák /Hopwood, 1977/ s élesztőgombák protoplaszt fúziójáról /Sipiczky, Ferenczy, 1977; van Solingen és van der Plaat, 1977/ megjelent tanulmányok után a Gram negatív E.coli PEG indukálta protoplaszt fúziója is bevonult az ezzel a mikroorganizmussal végezhető genetikai átviteli módok sorába /Tsenin, 1978/.

A bakteriális protoplaszt fúzió több alapvetően fontos vonásban különbözik az ismert genetikai átviteli formáktól. Míg a konjugáció, s R-faktorok által indított kromoszóma átvitel, transzformáció, transzdukció egyirányú információ átvitelt jelent, a fuzionáló protoplasztok egyenértékű partnerek. Ha a fúzió során rekombináció történik a genomok között, a sejtfalukat regenerált utódok között reciprok rekombinánsok találhatóak. A sokkal bonyolultabb rendszer sajátosságaitól eltekintve, a fúziós rekombinációs folyamatok leginkább a fággenomok közötti rekombinációs folyamatokhoz hasonlíthatók. A rendszer bonyolultságát pl. a citoplazmás hatások mutatják. Fodor és Alföldi munkájából ismert, hogy bizonyos genotípusú rekombinánsok életképességét /genetikai analízisben számszerű eloszlását/ fiziológiás hatások nagy mértékben befolyásolják /16/.

A protoplaszt fúzió két tekintetben is alapvetően új és érdekes módszer a bakteriális genetikában. Először is egy lehetséges mesterséges genetikai átviteli forma olyan baktériumok körében, amelyek más, természetes átviteli módokkal nem rendelkeznek /illetve ezek a módok még nem ismeretesek/.

Másodszor a fent említett tulajdonságai miatt, protoplaszt fúzióval új szempontból közelíthető meg a rekombinációs folyamatok tanulmányozása baktériumokban.

A *B.megaterium* törzsek protoplaszt fuzióját /s a fuzió utódok között kizáróan fuzióból származó rekombinánsok megjelenését/ Fodor és Alföldi írta le 1976-ban. A protoplasztok regenerációs sajátosságait vizsgálták, s létrehoztak egy mutánsparkot a *B.megaterium* rekombinációs folyamatainak tanulmányozása, illetve a baktérium kromoszóma térképének elkészítése céljából. Kísérleteikben a különböző auxotróf markerekkel rendelkező szülői protoplasztok fuziójából származó utódok zöme haploid és szülői genotípusu volt, de kb.  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  gyakorisággal haploid rekombinánsok, s szegregáló parciális diploid, diploid utódok jelentek meg.

A haploid rekombinánsok kétpontos térképezési elven, vagy kapcsoltsági analizissel történő térképezése nem adott megbízható eredményt, s valószínű, hogy a fuzió során bekövetkező rekombinációs események számszerű analízise a klasszikus térképezési elvektől eltérő megközelítést igényel. A már említett fiziológiás hatások, s a prototróf fenotípusu szegregáló utódok jelenléte is torzítja az elsődleges események számszerű értékelését.

Hopwood és munkatársai *Streptomyces coelicolor* /konjugációs térképe ismert/ törzsek protoplaszt fuziójából származó rekombináns utódok genetikai analizisét végezték el /26/. Eredményeik szerint a protoplaszt fuzióval nyert marker sorrend /térkép/ összevethető a konjugációs térképpel, de a fuzió során felmerülő zavaró tényezőket ez esetben is észlelték.

Összefoglalva, a bakteriális protoplaszt fúzió hasznos módszer a baktériumok genetikai folyamatainak vizsgálatára, különösen olyan esetekben, ahol ez az egyetlen ismert információ átviteli mód.

A protoplasztok preparálása, PEG-indukálta fúziója, baktériummá való regeneráltatása technikailag könnyen kivitelezhető, több baktérium fajra már kidolgozott eljárás. A fúzió során lejátszódó rekombinációs folyamatok, a rekombináns utódok genetikai analízise a jelen kutatások tárgya.

A kettős membránnal körülvett baktérium protoplasztok plazmid DNS-sel transzformálhatók is, ugyancsak PEG-indukció segítségével /Chang és Cohen, 1979/. A *B. megaterium* protoplasztok plazmid DNS-sel történő sikeres transzformációját Khmel és munkatársai /49/ írták le 1980-ban. *B. megaterium*ból, valamint *B. subtilis*ből származó plazmid preparátummal magas gyakoriságu átvitelt értek el. *B. subtilis* és *E. coli* plazmidokból in vitro nyert bifunkcionális replikonnal *B. megaterium* protoplasztok transzformálhatók voltak, s csakugy mint a *B. subtilis*-ben a *B. megaterium*ban is a *B. subtilis* plazmidrész által kódolt tulajdonság nyilvánult meg. A közelmúltban megjelent közlemény /Brown és Carlton, 1980/ *B. megaterium* protoplasztok *Staphylococcus aureus* és *Bacillus cereus* plazmidokkal történő további sikeres transzformációjáról számol be /2/.

A bakteriális protoplaszt fúzió mellett tehát egy további, bár egyelőre csak plazmid DNS bevitelére alkalmas genetikai átviteli mód áll rendelkezésünkre a *B. megaterium* genetikájának tanulmányozására.

Összefoglalva :

1. A *B.megaterium* 216 törzs bakteriocin termelő képességgel rendelkezik. A bakteriocin termékek egyike a megacinA, a foszfolipázA enzimmel azonos.
2. A megacinA szűk hatásspektrumu, de a *B.megaterium* törzsekre kivétel nélkül hat, beleértve a termelő törzset is.
3. Feltételezeten plazmid, vagy defektív profág által kódolt tulajdonság.
4. A termelő törzs a *B.megaterium* 216 összDNS-ének kb. 30%-át extrakromoszómális DNS alkotja, amelynek eredete, fiziológiai szerepe nem ismert.
5. A bakteriális protoplasztfúzió és plazmid DNS-sel végzett protoplaszt-transzformáció lehetőséget nyújt tulajdonságok átvitelére *B.megaterium* törzsek között, valamint az átvitt tulajdonságok megnyilvánulásának tanulmányozására.

## 2. CÉLKITÜZÉSEK

Az MTA Szegedi Biológiai Központ Mikrobiális Genetikai csoportjában a bakteriális protoplasztfuzióból származó utódok genetikai analizisét végeztük. Mint a bevezetőben már említettem, a csoport munkaterve *B.megaterium* mutánstörzsek-ből előállított protoplasztok fuzionáltatása, s a fuzió utódok genetikai analizise után kromoszóma térkép szerkesztése volt.

Az első kísérletekben a különböző auxotróf tulajdonságokat hordozó szülők fuziójából származó rekombináns utódokat direkt módon szelektálták. Ez azt jelenti, hogy a fuzionáltatott protoplasztokat olyan aminosavakkal megfelelően kiegészített ozmotikus minimál táptalajra rétegezték ki, ahol csak a rekombináns utódok voltak képesek anyagcserét folytatni, s sejtfalukat regenerálva baktérium kolóniákat létrehozni. Klasszikus térképezési elvek szerint így, a különböző genotípusú rekombinánsok számszerű eloszlása a kromoszómán elég közel lévő tulajdonságok sorrendjét és viszonylagos távolságát kellene hogy tükrözze.

Az első problémákat az eltérő genotípusú szülői és rekombináns protoplasztok különböző regenerációs képessége okozta, mivel ez bizonytalanná tette az adatok számszerű értékelését. A különböző regenerációs képesség a direkt szelekcióhoz alkalmazott, mindig változó fiziológiás környezettel függ össze. Ezeknek a zavaró tényezőknek a kiküszöbölésére a fuzió utódok kapcsoltsági analizisét vezettük be. A gene-

tikai rendszer egyszerűsítése céljából az egyik szülői protoplaszt szuszpenziót streptomocinnal inaktiváltuk, s ezzel a tulajdonság-átvitelt egyirányúvá tettük. A rekombinánsok szelekciója itt is minimál táptalajon történt /megfelelő aminosav kombinációkkal kiegészítve/, de a kapcsoltsági analízist mindig az azonos körülmények között regenerált utódok között végeztük el.

Ily módon viszonylag pontosan reprodukálható kísérleti rendszerrel állítottunk be, de néhány /2-2/ tulajdonság határozott kapcsoltságán kívül a markerek sorrendjét megállapítani nem tudtuk. A sok szegregáló prototróf utód megjelenése azt sugallta, hogy az egyik szülő inaktivációja talán megnöveli az ilyen fenotípusosan prototróf utódok kialakulásának gyakoriságát.

E kísérletekből nyert adatok alapján tehát kromoszóma térképet nem lehetett szerkeszteni, s ez két dologra hívta fel a figyelmünket. Először is a fúzió során lejátszódó genetikai események jellege nem ismert, így lehet, hogy klaszikus térképezési elvekkel ezeket leírni, értékelni nem lehet. A másik dolog ami figyelmünket a fúziótól eltérő irányba terelte az, hogy a *B. megaterium* genomjáról is igen kevés adat áll rendelkezésünkre. A bevezetőben említettem, hogy ami viszont ismert, az igen érdekes, s eléggé rendhagyó is. A két tanulmányozott *B. megaterium* törzs genomját igen sok "darab" alkotja. A kromoszómális DNS mellett az összDNS kb. 30%-a heterogén méretű extrakromoszómális DNS formában található.

Munkánk következő szakaszában azt kívántuk megvizsgálni, hogy vajon az általunk használt *B. megaterium* KM törzs is komp-

lex plazmid rendszerrel rendelkezik-e, s ha igen, milyen tulajdonságokat hordoznak ezek a plazmidok? Elképzelhető-e, hogy a fúziós eredmények analizisét befolyásolják vagy eltorzítják az extrakromoszómális DNS molekulák?

Az irodalmi adatok alapján feltételezhető volt, hogy életfontosságu tulajdonságok nemcsak a kromoszómális DNS-en, hanem plazmid DNS-en kódolva is előfordulhatnak.

Munkatervünk a következő volt :

1. A *B.megaterium* egyetlen törzsében ismert olyan tulajdonság, ami feltételezhetően plazmid kódolt: a 216 jelű törzs bakteriocin termelő tulajdonsága. Ezt a tulajdonságot átviszszük protoplaszt fúzióval a KM jelű törzsbe, s plazmid kódoltságát bizonyítjuk.
2. Megvizsgáljuk a *B.megaterium* KM törzs és származékai plazmid tartalmát, s összehasonlítjuk a *B.megaterium* 216 törzs plazmidjaival.
3. Azonosítjuk a *B.megaterium* 216 plazmidjai között a bakteriocin termelésért felelős plazmidot.
4. Ha a *B.megaterium* KM törzs is komplex plazmidrendszerrel rendelkezik, ezek fúzióbeli viselkedését vizsgáljuk, a már rendelkezésünkre álló, s bizonyítottan plazmid kódolt bakteriocin termelés marker segítségével.
5. Ugyancsak a bakteriocin plazmid segítségével elkezdjük a plazmidok és a kromoszómális DNS közötti azonosságok kimutatását és vizsgálatát.

Dolgozatom a munkaterv első három pontját tárgyalja.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### Baktériumtörzsek

| <u>NEVE</u>                                | <u>TULAJDONSÁGA</u>                                                             | <u>EREDETE</u>                                                  | <u>JELE</u> |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| Bacillus<br>megaterium 216                 | prototróf, spo-<br>rogén, megacina<br>termelő                                   | Ivanovics prof.<br>törzsgyűjte-<br>ménye                        | AF 216      |
| Bacillus<br>megaterium KM                  | prototróf, aspo-<br>rogén                                                       | Alföldi prof.<br>törzsgyűjte-<br>ménye                          | AF 100      |
| B.megaterium<br>ALTi Str <sup>r</sup>      | Arg <sup>-</sup> , Leu <sup>-</sup> , Timin <sup>-</sup> ,<br>streptomycin rez. | AF 100 NTG<br>mutagenézise                                      | AF 321      |
| B.megaterium<br>ALTi Str <sup>r</sup> megA | u.a. AF 321<br>és megA termelő                                                  | AF 216 és<br>AF 321 fúziója                                     | AF 321-1    |
| B.megaterium<br>THT Str <sup>r</sup>       | Tre <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Try <sup>-</sup> ,<br>Str rezisztens      | AF 100 NTG mu-<br>tagenezise                                    | AF 421      |
| B.megaterium<br>THT Str <sup>r</sup> megA  | u.a. mint AF 421<br>és megA termelő                                             | AF 321-1 és<br>AF 421 fúziója                                   | AF 421-1    |
| B.megaterium<br>THT Str <sup>r</sup> megA  | u.a. mint AF 421<br>és megA termelő                                             | AF 421 transz-<br>formációja<br>AF 216 összplaz-<br>mid DNS-sel | AF 421-1    |
| B.megaterium<br>prot.Str <sup>r</sup> megA | prototróf, Str<br>rezisztens, megA<br>termelő                                   | AF 321-1 és<br>AF 421 fúziója                                   | AF 421-4    |



### 3.1. Táptalajok

#### 3.1.1. Minimál tápfolyadék baktérium tenyésztéshez :

Tris 12 g; KCl 0,035 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0 g;  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  2 g;  
 $\text{NaCl}$  0,058 g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$  0,3 g; 1%  $\text{FeCl}_2$  0,05 ml/l liter  
 $\text{pH} = 7,5$ ,

Sterilezés  $121^\circ\text{C}$ -on 30 percig.

Sterilezés után a táptalajt 2% glükózzal,  $2 \times 10^{-2}\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -tal és  $10^{-3}\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ -dal egészítettük ki.

Szilárd táptalaj készítéshez 1,5% Difco agart adtunk.

#### 3.1.2. Minimál tápfolyadék protoplaszt preparáláshoz :

Megegyezik az 1. tápfolyadékkal, plusz 0,15 M szaharózt tartalmaz, és sterilezés után  $10^{-3}\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ -dal egészítettük ki.

#### 3.1.3. Minimál tápfolyadék protoplaszt regeneráltatáshoz :

Megegyezik a 2. tápfolyadékkal, de sterilezés után az 1.-hez hasonlóan,  $\text{MgCl}_2$ -dal és  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -tal van kiegészítve. Az alapagar 1%, a fedőagar 0,4% Difco agart tartalmaz.

#### 3.1.4. Gazdag táptalaj megacin teszteléshez : MTE

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,3 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g; Bacto Trypton 5 g;  $\text{NaCl}$  8 g; glükóz 1 g; Yeast extract /Difco/ 1g/l liter,  
 $\text{pH} = 7,5$ . Sterilezés  $110^\circ\text{C}$ -on 30 percig.

#### 3.1.5. Gazdag táptalaj baktérium tenyésztéshez : YTA

$\text{NaCl}$  5 g; Yeast extract 1 g; Bacto Trypton 10 g;  
1 M  $\text{MgSO}_4$  1ml; 1 M  $\text{CaCl}_2$  1 ml/l liter,  $\text{pH} = 7,2-7,3$ .  
Sterilezés  $110^\circ\text{C}$ -on 30 percig.

### 3.2. Baktérium tenyésztés

#### 3.2.1. Inokulumok

##### 3.2.1.a/ Inokulumok protoplaszt preparálási kísérletek-

hez: Saját minimál tápfolyadékában felnövesztett, logaritmikus tenyészet 1 térfogatát 2 térfogat 30%-os glicerinnel összekevertük, szétosztottuk 0,5 ml-es részletekre, s  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az azonos időben készített inokulumokat kb. 1-2 hónapig használtuk.

3.2.1.b/ Azokból a baktérium tenyészetekből, amelyeket plazmid preparálási kísérletre használtunk, kis, 10-20 ml-es előtenyészeteket készítettünk. A friss, logaritmikus előtenyészet részleteit használtuk inokulumként.

##### 3.2.2.a/ Baktérium tenyésztés protoplaszt fúziós kísér-

letekhez: 100-100 ml aminosavakkal (50  $\mu\text{g/ml}$ ), timinnel (100  $\mu\text{g/ml}$ ) megfelelő kombinációban kiegészített protoplasztoló tápfolyadékba 1-1 glicerines inokulumot oltottunk. A tenyészeteket éjszakán át  $30^{\circ}\text{C}$ -on rázattuk. Teljes mértékű protoplasztolódáshoz

$\text{OD}_{550}=0,7 - 0,8$  tenyészet az ideális.

##### 3.2.2.b/ Baktérium tenyésztés plazmid preparálási kísér-

letekhez : Plazmid preparáláshoz 100 ml - 101 térfogatu tenyészeteket használtunk fel. YTA tápfolyadék 1 térfogatához 1/100 térfogat előtenyészetet oltottunk. A tenyészeteket  $30-36^{\circ}\text{C}$ -on éjszakán át növesztettük. A kb.  $\text{OD}_{550}=1$  tenyészeteket 4 000 rpm-mel centrifugáltuk,

s az üledéket TS pufferrel /25% szaharóz, 50 mM Tris, pH = 8,0/ mostuk. A baktérium masszát vagy azonnal felhasználtuk, vagy  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.3. Protoplasztpreparálás /13/

A protoplasztoló tápfolyadékban felnevesztett baktérium tenyészetet (kb.  $10^8$  bakt/ml) lecentrifugáltuk /4 000 rpm, 15',  $4^{\circ}\text{C}$ / s az üledéket felszuszpendáltuk 1/10 térfogat  $\text{Mg}^{++}$ -mal kiegészített protoplasztoló folyadékban. 50  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációban lizozimet adtunk hozzá; s 20-30 percig  $36^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük a protoplasztolódás mértékét. Az így készített preparátumban rendszerint alig található pálcika alakú baktérium, a tenyészet zöme gömb formájú protoplaszttá alakul.

A protoplaszt szuszpenziót centrifugáltuk /4 000 rpm, 20',  $4^{\circ}\text{C}$ /, s felvettük 1/10 térfogat  $\text{Mg}^{++}$ -mal kiegészített protoplasztoló oldatban.

### 3.4. Protoplasztfúzió

A szülői protoplaszt szuszpenziók 0,1 - 0,1 ml-ét (kb.  $10^7$ - $10^8$  protoplaszt/ml) összekevertük, és 0,8 ml 40%-os PEG /6 000/ oldatot adtunk hozzá. Óvatosan összeráztuk, s 2-10 percig szobahőn inkubáltuk. A fúziós elegyeket megfelelő módon higitottuk, s lágy agarba keverve lemezeltük.

### 3.5. Protoplaszt regeneráció

A fúziós elegy 0.1 ml-ét 2 ml 40°C-os, ozmotikus, 0,4%-os minimál fedőagarba kevertük és a szelekciónak megfelelően előkészített alapagar felszínére rétegeztük. 30°C-os termosztátszekrényben 2-4 napig inkubáltuk. A törzsenként változó kisebb eltérésektől eltekintve a B.megacínium protoplasztjainak regenerációs gyakorisága gyakorlatilag 100%-os.

### 3.6. Protoplaszt transzformáció plazmid DNS-sel

A transzformálandó baktérium tenyészetből protoplasztot preparáltunk. 0,1 ml ( $5 \times 10^8$  pplt/ml) protoplaszt szuszpenzióhoz 10 µg/100 µl plazmid DNS preparátumot adtunk. Óvatosan összeráztuk, majd egyenlő térfogatu 20%-os PEG /6 000/ oldattal összekevertük, s szobahőn két percig inkubáltuk. A protoplasztokat a DNS felvételi lépés után ozmotikus körülmények között regeneráltattuk. A megacínA termelő transzformánsokat öndetekcióval mutattuk ki. Olyan higitásokat készítettünk, ahol a regeneráló baktériumok pázsitot képeznek, s e pázsitban a megacínA termelő telepek körül tiszta oldási zóna látható. Az ily módon kisselektált telepeket tisztítottuk, auxotrófiájukat, megacínA termelő képességüket újra ellenőriztük.

### 3.7. Gélelektroforézis

Az elektroforézist 0,7-1%-os, 3 mm vastagságú vertikális agaróz /Sigma/ lapgélén végeztük. A géleket Helling et al. szerint készítettük /22/. Az elektródpuffer összetétele a következő volt: 50 mM Tris HCl pH = 8,0, 20 mM Na-acetát, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl. Az elektroforézist lassu futtatás esetén 30 V feszültség mellett 14 óráig, gyors futtatás esetén 60 V feszültséggel 6 óráig folytattuk. Az elektroforézis befejeztével a géleket 0,5 µg/ml etidium bromidot tartalmazó elektroforézis pufferben festettük 20-30 percig, majd rövidhullámhosszu UV lámpa alatt értékeltük, illetve fényképeztük narancsvörös szűrőt használva.

### 3.8. CsCl-EtBr egyensúlyi sűrűségi grádiens centrifugálás /39/

A Curier-Nester módszerrel részlegesen tisztított DNS preparátumot 1,58 gr/cm<sup>3</sup> CsCl, 500 µg/ml EtBr jelenlétében 36 000 rpm-mel, 15°C-on 48-60 óráig Sorvall T.658-1 rotorban centrifugáltuk. A supercoiled plazmid DNS-t tartalmazó frakciót összegyűjtöttük, s az etidium bromidot i-amilalkoholos extrakcióval, a CsCl-ot 20 mM Tris.HCl /pH = 8,0/; 2 mM EDTA pufferrel szemben való dializissel eltávolítottuk. A plazmid DNS-t 2 térfogat alkohol és 0,1 térfogat kálium-acetáttal kicsaptuk, s centrifugálás után /16 000 rpm, 4°C, 1 óra/ 10 mM Tris.HCl /pH = 8,0/; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA-t tartalmazó pufferben feloldottuk.

### 3.9. Restriktációs endonukleáz reakciók

A plazmid DNS-ek emésztéseihez EcoRI, SalI, BamHI, HindIII, PstI restriktációs endonukleázokat használtunk. Az emésztési elegyek 0,5-2  $\mu$ g DNS-t, s 1-5  $\lambda$ -egység restriktációs enzimet tartalmaztak.

EcoRI enzimmel történő emésztéshez 0,1 M Tris-HCl pH = 7,5, 5 mM  $MgCl_2$ , 150 mM NaCl összetételű, a többi enzimmel történő emésztéshez 10 mM Tris-HCl pH = 7,5, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 2-merkaptoetanol összetételű /Hind-puffer/ puffert használtunk. A reakció elegyek /50-100  $\mu$ l/ összetétele a következő volt :

1/5 térfogat ötszörös töménységű enzimpuffer, 4/5 térfogat DNS, enzim, viz. Az emésztéseket 37°C-on 4-24 órás időtartammal végeztük. A reakciókat 1/5 térfogat 50%-os szaharóz, 0,2 M EDTA, 0,1% brómfenolkék oldattal állítottuk le.

### 3.10. A fuziók utódok tesztelése

Szelektálás auxotróf markerekre: a regenerált baktérium telepeket paralell a kívánt aminosavak, illetve bázisok különböző kombinációjával kiegészített minimál lemezekre inokuláltuk.

Szelektálás megacinaA termelő utódokra : a fenti ellenőrző sorozat utolsó lemezeként egy MTE lemezt használtunk. A ráoltott baktérium kolóniákat kb. 12 órás, 30°C-on történő inkubáció után kloroform gőzzel előltük

és megacinaA érzékeny törzs /rendszerint AF100/ öreg tenyészetével felülrétegeztük. A megacinaA termelő telepek körül 1-10 mm széles baktérium mentes zóna volt detektálható.

Plazmid tartalom tesztelése : mind a törzsek viszonylag gyors tesztelésére, mind a plazmid DNS preparatív célú tisztítására a Currier-Nester módszert / 9/ használtuk kisebb módosításokkal /10/. A tesztelés a plazmid DNS részleges tisztításával, s azt követő agaróz gélelektroforézissel történt. A vizsgálandó baktérium kolóniákat 100 ml YTA folyadékba oldottuk, s 34-36°C-on éjszakán át rázattuk. A tenyészetet lecentrifugáltuk /4000 rpm, 10'/, és kimostuk TS pufferrel /50 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 25% szaharóz/. Az üledéket 3,3 ml TS pufferben vettük fel, 0,66 ml lizozimot adtunk /1 mg/ml 50 mM Tris-HCl-ben oldva, pH = 8,0/ és 20 percig 36°C-on inkubáltuk. Ezután 1,3 ml 0,25 M EDTA-t /pH = 8,0/ mértünk hozzá, s ujjabb 20 percig 36°C-on tartottuk. A sejteket 6 ml lizáló eleggyel feltártuk /3% Triton X-100; 0,19 M EDTA; 0,15 mM Tris-HCl, pH = 8,0/. Az így nyert lizátumot 16 000 rpm-mel centrifugáltuk /Sorval SS-34 rotor/. Az üledéket 8 ml TE pufferben /50 mM Tris; 20 mM EDTA; pH=8,0/ szuszpendáltuk. Az oldat viszkozitását pipettázással csökkenttük, majd 3 N NaOH-ot csöpögtettünk hozzá, pH = 12,2-12,4 értékig. 5 percig lassan kevertettük, s a denaturálódott DNS-t tartalmazó oldatot 5,5 pH-ju 2 M Tris-HCl puffer csepenkénti adásával neutralizáltuk pH = 8,6 értékig. A denaturált kromoszómális DNS-t tömény NaCl oldattal /3%-os végkoncentráció mellett/ kicsaptuk, majd egyenlő térfogatu fenollal és kloroform-i-amilalkohol 24:1 arányu elegyével az olda-

tot extraháltuk. A vizes fázisban feldusult plazmid DNS-t 0,1 térfogat Kálium-acetát adása után 2 térfogat hideg alkohollal  $-20^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át kicsaptuk. Az alkoholos csapadékot 16 000 rpm-mel lecentrifugáltuk /Sorval SS-34 rotor/. A csapadékot víztelenítettük és 200-500  $\mu\text{l}$  DNS dializáló oldatban /10 mM Tris, 10 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH = 8,0/ feloldottuk. A DNS minták 10-50  $\mu\text{l}$ -ét 0,7-1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk.

### 3.11. Plazmid DNS-ek filter hibridizációja

#### 3.11.1. Filter készítés

Az emésztetlen vagy restrikciós enzimekkel emésztett plazmid DNS-eket 0,7-1,0 %-os agaróz gélen elektroforézissel elválasztottuk. Az EtBr-dal festett géleket fényképeztük, majd a gélben lévő DNS-t vagy DNS fragmentumokat nitrocellulóz filterre vittük át a Southern-technika /47/ alkalmazásával. A géleket 0,25 M HCl-val kezeltük 15 percig, majd 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl összetételű denaturáló oldatba helyeztük. 20 perces mosás után az oldatot cseréltük s a denaturálás újabb 20 perce után 0,5 M Tris-HCl, pH = 7,0; 1,5 M NaCl összetételű neutralizáló folyadékba helyeztük. 20 percig mostuk, majd a kezelést megismételtük.

A gél méretével azonos nagyságu filtereket 2 x SSC oldatba áztattuk /1 x SSC : 0,15 NaCl; 0,015 M Na-citrát, pH = 7,0/. A denaturáció során létrejött egyszálu DNS molekulákat az előkezelt nitrocellulóz filterre szivattuk át a gélből, a gél és a filter közötti folyadék transzfert /20 x SSC/ szűrő-



papír felülrétegezéssel biztosítottuk. 20-24 óra transzfer után a géleket újra festettük, s ellenőriztük az átvitel hatékonyságát. A filtereket 2 x SSC-vel mostuk, majd 80°C-on vákumban 2 óra hosszát szárítottuk, a DNS-t irreverzibilisen a filterre kötöttük.

### 3.11.2. $^{32}\text{P}$ -jelölt próba készítése

1-2  $\mu\text{g}$  DNS-t  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP-vel /spec. act. 800 Ci/mmol/ nick-transzlálással jelöltünk Righby szerint. A minták spec. aktivitása  $10$ - $12 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$  volt.

### 3.11.3. Hibridizálás

A filtereket 5 x SSC; 5 x Denhardt oldatban 67°C-on 6 órát inkubáltuk, az aspecifikus DNS kötés csökkentése céljából. A  $^{32}\text{P}$ -vel jelölt DNS mintákat csirke vörösvértest DNS hordozó jelenlétében 50% formamidban 10 percig 100°C-on denaturáltuk, majd a nylon zsákba ragasztott filterekre mértük és 24 óráig 37°C-on hibridizáltattuk a következő összetételű hibridizációs elegy 12 ml-ében:

5 x SSC

50% formamid

1 x Denhardt oldat /0,02% polyvinilpyrrolinon; 0,02%

Ficoll; 0,02% marha szérum albumin/

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  csirke vörösvértest DNS

$^{32}\text{P}$ -vel jelölt próba DNS /1-2  $\mu\text{g}/10$ - $20 \times 10^6$  cpm/

A hibridizáció befejezése után a filterhez nem kötődött radioaktív anyagot mosással eltávolítottuk. A mosást

4 x 30 percig 2 x SSC oldattal végeztük szobahőn. A mosott filtereket megszáritottuk, majd autoradiografáltuk Kodak

X-OMAT R röntgenfilm és erősítő fólia felhasználásával.

#### 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

##### 4.1. Törzskonstrukció

A kísérleteinkben használt *Bacillus megaterium* 216 törzs /AF216/ prototróf, sporogén törzs, s jelentős mennyiségű extrakromoszómális DNS-t tartalmaz. A genetikai és biokémiai vizsgálatokhoz célszerű volt a megacinaA termelő tulajdonságot genetikailag jellemzett *B.megaterium* törzsekbe, s a lehetőségektől függően plazmidmentes származékokba átvinni.

Laboratóriumunkban a *B.megaterium* KM törzsének /AF100/ számos auxotróf mutánsa állt rendelkezésünkre, bár plazmidtartalmuk még nem volt ismeretes. A tulajdonság-átvitel "recipiensének" egy háromszoros auxotróf *B.megaterium* KM származékot választottunk, az  $\text{Arg}^- \text{Leu}^- \text{Ti}^- \text{Str}^r$  törzset /AF321/. A prototróf megacinaA "donor" ellenszelekciójára a  $\text{Timin}^-$  mutánsok trimetoprim rezisztenciáját használtuk fel. A megacinaA termelő rekombináns fúziós utódok izolálása a következőképpen történt :

elvégeztük a protoplaszt fúziót az AF216 és AF321 törzsek között. A fúziós utódokat szelekció nélkül hagytuk regenerálódni Arg, Leu, Ti-nel kiegészített ozmótikus minimál táptalajon, olyan higitásban, hogy összefüggő baktérium pázsitot kapjunk. A regenerált baktérium pázsitról egy



kacsnyit Arg, Leu, Ti és timetoprim tartalmu minimál folyadékba oltottunk. A benőtt, trimetoprim rezisztens tenyészetet kihigítottuk, és Arg, Leu, Ti, Trim tartalmu táptalajra szélesztettük. Az izolált klónok tulajdonságait replikázással ellenőriztük, s az utolsó /MTE/ lemezen a megacinaA termelést teszteltük. A trimetoprim rezisztens klónok között nagy gyakorisággal /kb.: 10%/ nyertünk megacinaA termelő utódokat. Ezek egy része az auxotróf markerekre is rekombináns volt :

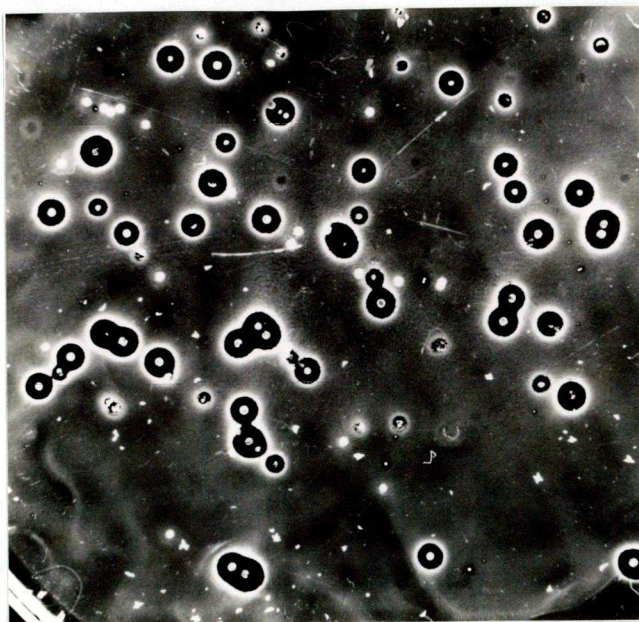
Arg<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Ti<sup>-</sup> Trim<sup>r</sup> Str<sup>r</sup> megA  
Arg<sup>-</sup> Leu<sup>+</sup> Ti<sup>-</sup> Trim<sup>r</sup> Str<sup>r</sup> megA  
Arg<sup>+</sup> Leu<sup>-</sup> Ti<sup>-</sup> Trim<sup>r</sup> Str<sup>r</sup> megA  
Arg<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Ti<sup>-</sup> Trim<sup>r</sup> Str<sup>r</sup> megA

A B.megaterium KM törzs további származékaiba az Arg<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Ti<sup>-</sup> Str<sup>r</sup> megA /AF321-1/ törzs fúziójával vittük át a megacिनogéniát. Rendelkezésünkre állt tehát néhány, genetikai markert hordozó megacinaA termelő törzs, amelyekben először megvizsgáltuk a tulajdonságok stabilitását.

#### 4.2. A tulajdonságok stabilitása

Már a megacinaA termelő klónok tisztítása és ellenőrzése során nyilvánvalóvá vált, hogy a termelőkéesség nem stabil tulajdonság. Tiszta tenyészetekben mintegy 30%-os gyakorisággal spontán nem termelő utódok jelentek meg /1. ábra/.

A fotó az AF321-1 törzs spontán szegregációját mutatja. Az érzékeny baktérium pázsiton /AF100/ számos klón nem hoz létre oldási zónát. A spontán szegregáció a tulajdonság plazmidkódoltságára utal, ezért megpróbáltuk továbbemelni



1. ábra

a szegregáció gyakoriságát plazmidtörölő szer alkalmazásával. Plazmidtörölő szernek ethidium-bromid oldatot használtunk, 0,0-0,2  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban.

Az eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze :

| Baktérium törzs | EtBr konc. $\mu\text{g/ml}$ | A vizsgált telepek száma | megA <sup>-</sup> telep száma | megA <sup>-</sup> szegr. %-os gyak. |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| AF216           | 0                           | néhány ezer              | 0                             | 0                                   |
|                 | 0,2                         | néhány ezer              | 0                             | 0                                   |
| AF321-1         | 0                           | 2192                     | 657                           | 29,97                               |
|                 | 0,1                         | 3143                     | 1104                          | 35,17                               |
| AF421-4         | 0                           | 1266                     | 390                           | 30,8                                |
|                 | 0,025                       | 1144                     | 450                           | 39,3                                |
|                 | 0,05                        | 1506                     | 960                           | 63,7                                |
|                 | 0,1                         | 673                      | 589                           | 87,5                                |

Az itt feltüntetetteken kívül további 5 megacinaA termelő törzs spontán és indukált szegregációját vizsgáltuk meg /37/.

Összegezve, azt az eredményt kaptuk, hogy az eredeti izolátum az AF216 törzs, igen stabil a megacinaA termelés szempontjából. Kísérleteink során egyetlen nem termelő klónt sem izoláltunk. Az AF100 törzs összes származéka viszont kissé eltérő, de átlagosan 30%-os gyakorisággal spontán veszti e tulajdonságot. A plazmidtörölő szer hatása az egyes törzsekben eltérő, a megacinaA termelés 30-90%-os vesztését indukálja. A megacinaA termelés tesztelésével párhuzamosan minden egyes törzs auxotrófia és rezisztencia markereit is ellenőriztük, s ezek a tulajdonságok mindig stabilnak mutatkoztak.

A B.megaterium KM törzs és mutáns származékainak extrakromoszómális DNS-éről az irodalomban nem állt rendelkezésünkre adat. Így a megacinaA átviteli kísérletekkel párhuzamosan a fúziós partnerek és néhány további törzs plazmid tartalmát vizsgáltuk meg.

#### 4.3. A B.megaterium AF100 törzs és származékai plazmid-tartalmának kimutatása

Az AF216, AF100, AF321, AF321-1 és AF421 jelű törzsek tenyészeiteiből az Anyagok és Módszerek fejezetben ismertetett módszerrel részleges plazmid tisztítást végeztünk. A plazmid preparátumokat agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk és hasonlítottuk össze.

Az AF216 törzs extrakromoszómális DNS-e jól tanulmányozott, a plazmid osztályok száma és méretei ismeretesek. Ezért az AF216 törzs plazmidpreparátumát durva molekulasúly referenciának is használtuk.

Az elektroforetikus vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy mind az AF100 törzs, mind auxotróf származékai /egy kivétellel/ tartalmaznak plazmid DNS-t /2. ábra/.

Az AF100 törzs legnagyobb plazmidja, az AF216 törzs plazmidjaihoz viszonyítva kb. 30 MD nagyságu, s jóval nagyobb mennyiségben két kisebb mólsúlyu plazmid is jelen van.

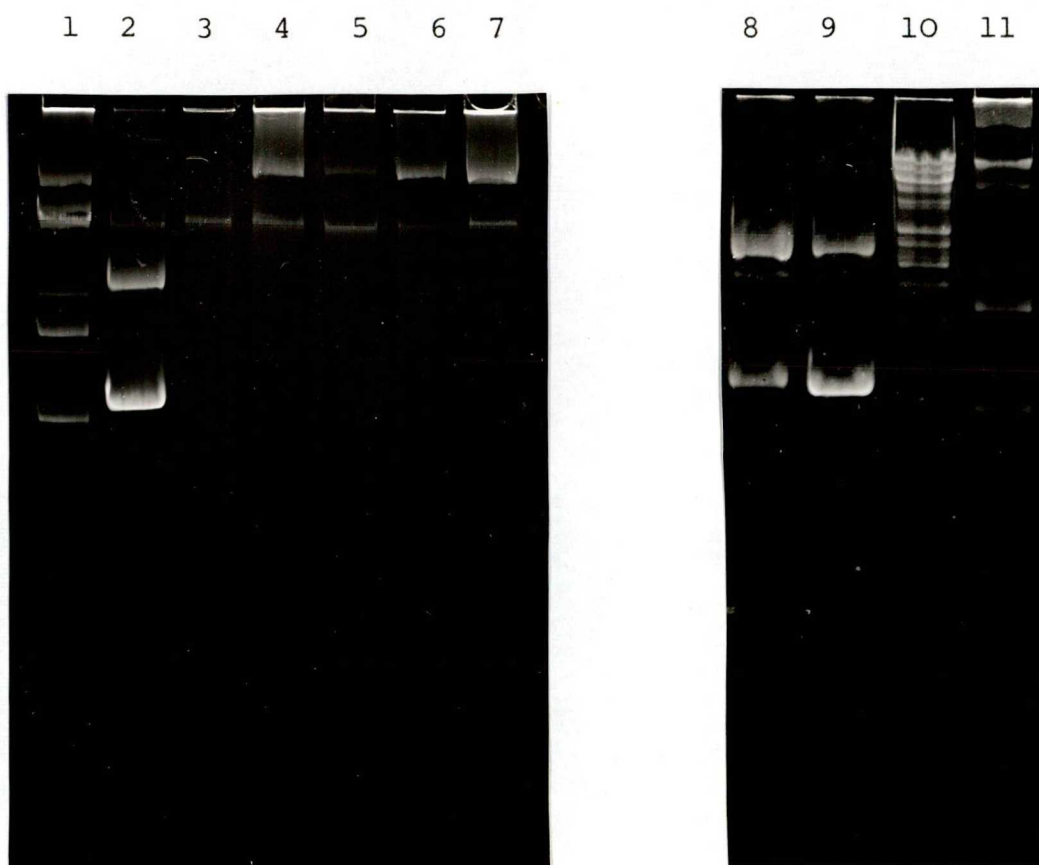
Az AF321 törzs csak a legnagyobb méretű, 30MD mólsúlyu plazmid DNS-t tartalmazza, a két kis mólsúlyu plazmid DNS eltűnt, valószínűleg a többszöri NTG mutagenesis eredményeképpen. Az AF321-1 törzs az AF321 törzsszel azonosnak tűnő, kb.: 30 MD mólsúlyu plazmid DNS-t tartalmaz. A 2. ábra 5., 6. és 7. preparátumáról később lesz szó.

Az eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze :

| <u>A_törzs_jele</u>  | AF216          | AF100 | AF321          | AF321-1 | AF421 |
|----------------------|----------------|-------|----------------|---------|-------|
| <u>Plazmid_oszt.</u> | 6 <sup>1</sup> | 3     | 1 <sup>2</sup> | 1       | 0     |

1. Az AF216 törzs 10 plazmid osztályából agaróz gélelektroforézissel csak 6 detektálható.
2. Az AF321 törzs igen kis mennyiségben tartalmaz egy 30 MD mólsúlyu plazmid DNS-t.

Mivel az AF321 és AF321-1 törzs azonosnak tűnő plazmid DNS-t tartalmaz, bizonytalanná vált, hogy fúzió során valóban plazmid átvitel történt-e. Ha feltételezzük, hogy igen, a fúzió során az AF216 törzsből valamelyik plazmid átvivődött, elképzelhető, hogy :



2. ábra

1 : AF216

2 : AF100

3 : AF321

4 : AF321-1

5 : AF421-4

6 : AF421-1 transzf.

7 : AF421-1 fuzió

8 : AF100 + BamHI

9 : AF100

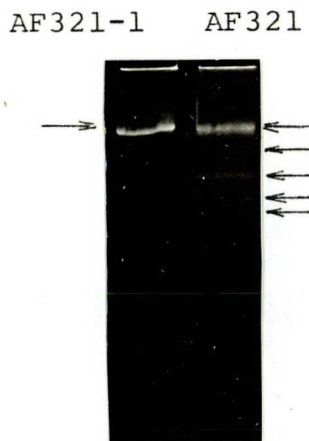
10 : AF216 + BamHI

11 : AF216



1. az AF321-1 törzs két különböző plazmidot tartalmaz, s ezek kb. azonos nagyságúak;
2. az AF321 rezidens plazmidja eliminálódott, s csak az átvitt plazmid van jelen;
3. az AF216 törzs egyik plazmidja átkerült ugyan, de vagy a rezidens plazmiddal, vagy a kromoszómális DNS-sel rekombinálódott.

A kérdés eldöntésére az AF321 és AF321-1 törzs plazmid DNS-ét CsCl-EtBr gradiens centrifugálással tisztítottuk, s BamHI restrikciós endonukleázzal megemésztettük. A két plazmid DNS restrikciós fragmentképét a következő ábra mutatja :



3. ábra

A BamHI enzim egyetlen hasító hellyel rendelkezik az AF321-1 törzsből izolált plazmid DNS-en, amíg legalább 3-4 új fragmentumot eredményez az AF321 plazmid emésztése.

Ha az AF321-1 törzs mindkét plazmidot tartalmazná, vagy az



AF321 plazmid szerkezete megváltozott volna /rekombináció, deléció, inverzió/, az AF321-1 plazmid a meglévő egy helyett több BamHI hasító helyet kellene hogy hordozzon. Elfogadhatjuk tehát azt a tényt, hogy az AF321 törzs rezidens plazmidja eliminálódott.

Az eddigi eredményeket a következőképpen foglalhatjuk össze :

1. Mivel más lehetséges mód nem állt rendelkezésünkre, a megacinA termelő tulajdonságot protoplasztfúzióval vittük át a B.megaterium 216 /AF216/ törzsből a B.megaterium KM törzs auxotróf mutánsába /AF321/.
2. A megacinA termelő fúziós utódok nagy gyakorisággal szegregálnak.
3. Az AF321-1 törzsben kimutattunk egy, az AF321 törzs plazmidjától különböző plazmid DNS-t, amelynek molekulasúlya ~30 MD, látszólag megegyező az AF216 30 MD plazmid kategóriájával.

Ezek az eredmények azonban még nem bizonyítják közvetlenül, hogy a megacinA termelés valóban az átvitt plazmidon kódolt tulajdonság, tekintve a protoplasztfúziós kísérletek bevezetésben leírt kiértékelési problémáit. Ennek bizonyítását két kísérlettel kívántuk elvégezni :

1. kihasználva az AF421 törzs plazmid mentességét, olyan fúziós rendszert terveztünk, amelyben a megacinA termelés átvitele, szegregációja közvetlenül követhető a plazmid DNS kimutatásával.

2. Ugyancsak az AF421 törzset használva, az AF216 törzs plazmid DNS-ével protoplaszt transzformációt végeztünk, s ezzel a megacinaA termelő transzformánsokból az AF216 plazmidját azonosítani tudtuk.

Az AF321-1 törzs háromszoros auxotróf, Str rezisztens, megacinaA termelő és egy kb. 30 MD molekulásulyu plazmid DNS-t tartalmaz. Fúziós partnere az AF421 törzs, szintén három auxotrófia markert hordoz, amelyek az AF321-1 markereitől eltérnek, soha nem volt megacinaA termelő és nem tartalmaz plazmid DNS-t. A fúzió elvégzése után többféle tulajdonság átvitelére szelektálhattunk.

Elsőnek izoláltunk olyan fúziós utódot, amely csak a megacinaA termelést hordozta, mint új tulajdonságot, egyébként AF421 szülői genotípusu volt. A plazmid tartalom tesztelésekor bebizonyosodott, hogy a megacinaA termeléssel párhuzamosan egy plazmid DNS is átkerült az AF321-1 törzsből. Az AF421-1 baktériumok további tenyésztés során megacinaA nem termelő utódokat szegregáltak, s ezek a sejtek plazmidjukat is elvesztették.

A továbbiakban a fúziós elegy minimál táptalajon történő regeneráltatásával prototróf tulajdonságu fúziós utódokat izoláltunk.

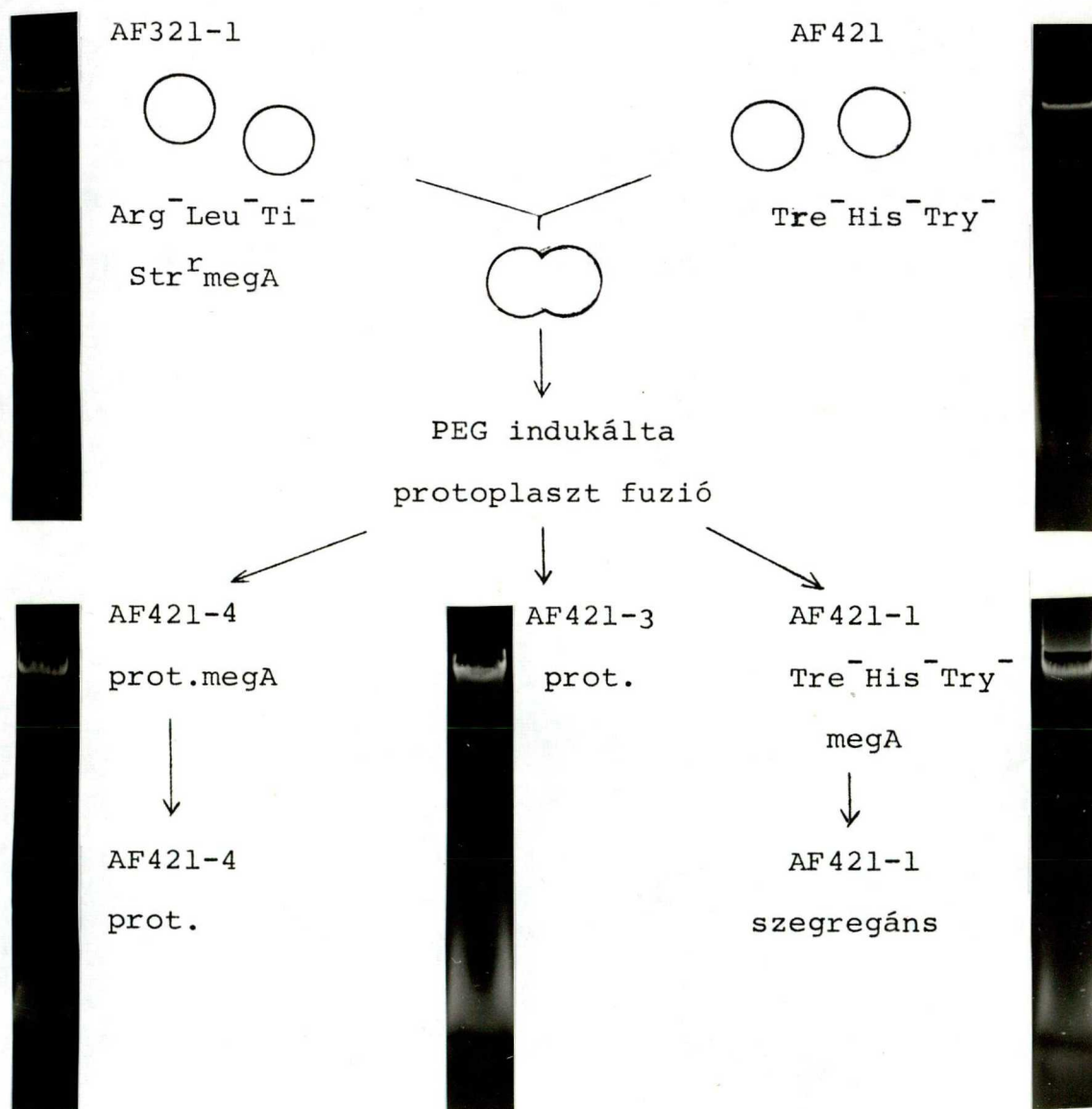
Azok a prototróf kolóniák, amelyek egyben megacinaA termelőkké is váltak, plazmid DNS-t is hordoztak. A megacinaA nem termelő plazmid mentesek voltak.

Hasonló volt a plazmid tartalmuk a prototróf megacinaA termelő és megacinaA nem termelő szegregánsoknak.

A megacinaA termelés és a plazmid jelenléte tehát mindig

A megacinaA termelés és a plazmid átvitel kapcsolata fúziós rendszerben

A kísérlet vázlatát az alábbi ábra mutatja :



együtt észlelhető, kapcsoltságot mutat.

Érdekes megjegyezni, hogy az AF321-1 és AF421 törzsek fúziójából nyert prototróf megacinA nem termelő rekombinánsok nem tartalmaznak plazmid DNS-t, míg az eredeti AF100 prototróf törzsben három különböző méretű molekulát találunk. Feltételezhetjük, hogy a plazmid molekulákon nincs életfontosságú tulajdonság kódolva, s a nem szelektált markerként használt streptomycin rezisztencia is bizonyosan kromoszómális tulajdonság.

#### 4.4. AF216 totál plazmid DNS-sel történő protoplaszt transzformáció

Az AF216 törzs plazmid DNS-ét CsCl-EtBr gradiens centrifugálással tisztítottuk. A törzs összes plazmidját tartalmazó DNS preparátummal transzformáltuk az AF421 törzs protoplaszt szuszpenzióját.

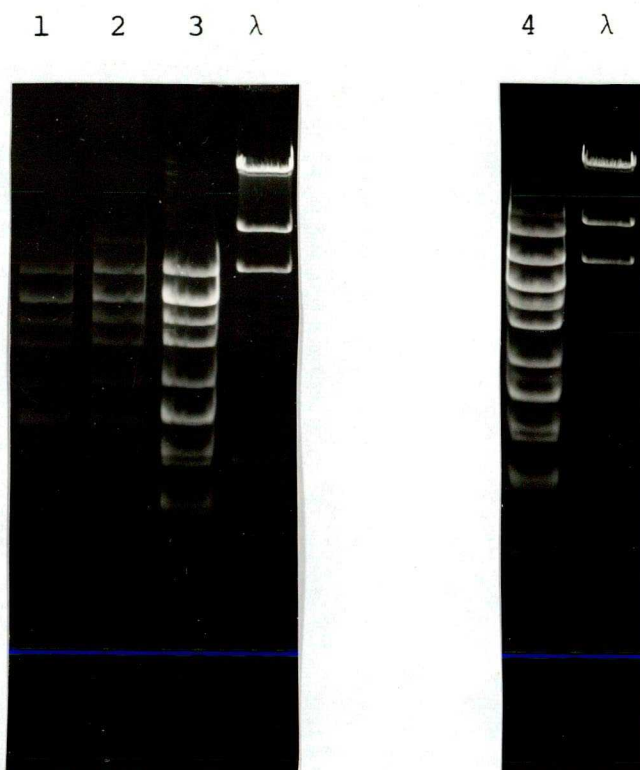
A transzformáció eredményeként megacinA termelő kolóniákat kaptunk. A transzformánsok elektroforetikus mobilitás alapján az AF321-1 törzs által hordozott plazmiddal azonos nagyságú plazmid DNS-t tartalmaztak. Genotipusuk  $Tre^{-}His^{-}Try^{-}megA$  volt /2. ábra 5., 6., 7. jelű mintái/.

A tisztított plazmid DNS-sel történő transzformáció direkt bizonyíték arra, hogy az AF421 törzs protoplasztjaiba plazmid DNS vitte át a megacinA termelő képességet. Az irodalomból azonban ismert, hogy az AF216 törzs genomjának komplikált a szerkezete /nagy extrakromoszómális DNS tartalom, ennek feltételezett azonossága a kromoszómális DNS-sel/, s így nem



zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy ebben a törzsben a megacinaA termelést meghatározó DNS szekvencia a kromoszómán is előfordul.

Az AF216 és AF321 törzsek protoplasztfúziójakor a két szülői genom közvetlen kapcsolatba kerül egymással, a kromoszómális tulajdonságok rekombinálódhatnak, s a citoplazmák keveredése révén a plazmid molekulák is új kombinációban kerülhetnek át az utódsejtekbe. Annak eldöntésére, hogy ez az új kombináció csak különböző molekula típust jelent, vagy megváltozott molekula szerkezetet is, összehasonlítottuk az AF421-1 transzformáns és az AF321-1, AF421-1, AF421-4 fúzióból származó törzsek plazmid DNS-ét, HindIII restrikciós endonukleáz emésztést követően.



4. ábra

1. AF421-1 transzformáns; 2. AF421-1 fúziós származék;  
3. AF321-1; 4. AF421-4;  
λ: HindIII enzimmel emésztve

Az emésztési képen látható, hogy mind a transzformáns, mind a fuzióból eredő megacinaA termelő törzsek plazmid DNS-ének HindIII enzimmel nyert emésztési fragment képe azonos. A fuzió során a plazmid molekula szerkezete nem változott meg.

#### 4.5. Az AF216 törzs megacinaA termelést kódoló plazmidjának kiválasztása

Az AF216 törzs plazmidjainak molekulásulya Carlton és munkatársai munkájából ismert. Az AF100 mutánsok fuzióval, vagy transzformációval nyert megacinaA termelő törzsei csak egy, a megacinaA termelést kódoló plazmidot tartalmazzák. A plazmid molekulásulyának meghatározása után az AF216 törzs 10 plazmidjából a megacinaA termelést determináló plazmidkategória azonosítható.

E célból az AF321-1 törzs plazmid DNS-nek néhány restrikciós endonukleázzal végzett emésztését végeztük el. Mivel laboratóriumunkkal kollaborációban szovjet kutatók ugyanennek a plazmidnak a részletes fizikai térképezését végezték, megelégedtünk az azonosításhoz elegendő adatok megszerzésével. Adatainkat a fénykép és a táblázat foglalja össze /5. ábra/.

Az emésztési eredményekből látható, hogy a BamHI enzim egyetlen hasítóhellyel rendelkezik a plazmid molekulán.



5. ábra

Az AF321-1 törzs plazmid DNS-e :

1. HindIII

2. BamHI

3. Sali

4. Sali

5. BamHI + Sali      enzimekkel emésztve

λ: HindIII enzimmal emésztve



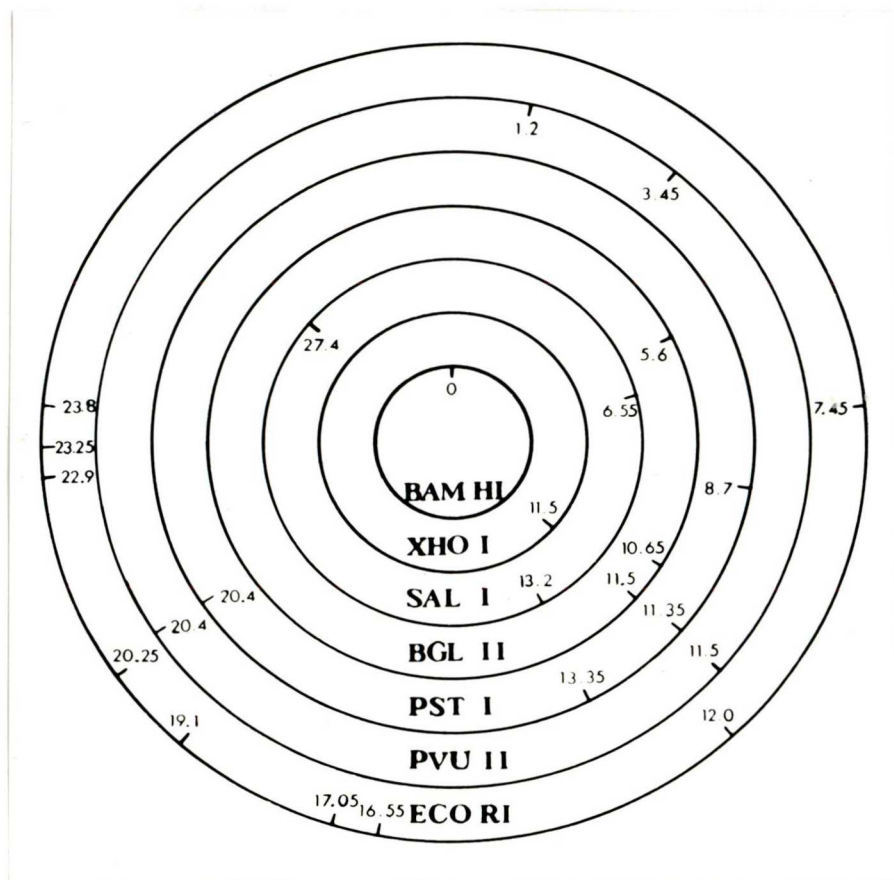
| Az emésztéshez használt enzimek                                       |       |              |            |            |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|--------------|------------|------------|
| SalI                                                                  | BamHI | SalI + BamHI | HindIII    | EcoRI      |
| Az emésztéssel nyert fragmentumok molekulasulya<br>MD-ban van megadva |       |              |            |            |
| 11.7                                                                  | 31.0  | 11.5         | 4.0, 3.3   | 5.8, 4.2   |
| 8.8                                                                   |       | 6.4          | 3.0, 2.7   | 3.8, 3.45  |
| 6.4                                                                   |       | 6.0          | 2.15, 1.85 | 2.65, 2.2  |
|                                                                       |       | 3.4          | 1.55, 1.50 | 1.85, 1.6  |
|                                                                       |       |              | 1.25, 1.2  | 1.15, 0.96 |
|                                                                       |       |              | 0.9, 0.8   | 0.88, 0.77 |
|                                                                       |       |              | 0.72, 0.56 |            |
|                                                                       |       |              | 0.34       |            |
| 26.7                                                                  | 31.0  | 27.3         | 25.82      | 29.32      |

SalI enzimmal történő emésztés 3 fragmentumot eredményez, s a SalI + BamHI kettős emésztés egy új fragmentuma valószínűsíti, hogy a BamHI hasítóhely a SalI emésztéssel nyert 2. legnagyobb fragmentumon van.

HindIII és EcoRI enzimekkel /lásd 4. ábra/ végzett emésztéssel sok kis molekulásulyu fragmentumot kaptunk, amelyek közül számos a HindIII emésztési képen azonos mobilitásu.

Az itt nyert adatok alapján a plazmid molekulasulya 26-31 MD. Szovjet munkatársaink a pontos értéket 30,9 MD-ban állapították meg. A 6. ábra az általuk elkészített fizikai térképét mutatja.





6. ábra

A baktérium rendszertani nevének kezdőbetűiből, s a molekulasúly számjegyeiből képezve a plazmid a pBM309 jelet kapta.

Az irodalomból ismert, hogy az AF216 törzs plazmidjai azonos szekvenciákat tartalmaznak. Az AF100 törzs 3 plazmid DNS-éről nincs irodalmi adat. Érdekesnek látszott annak ellenőrzése, hogy a pBM309 plazmid vajon egyedi szekvenciájú-e, vagy szintén tartalmaz olyan szakaszokat, amelyek más molekulasúlyú plazmidokon is megtalálhatók.

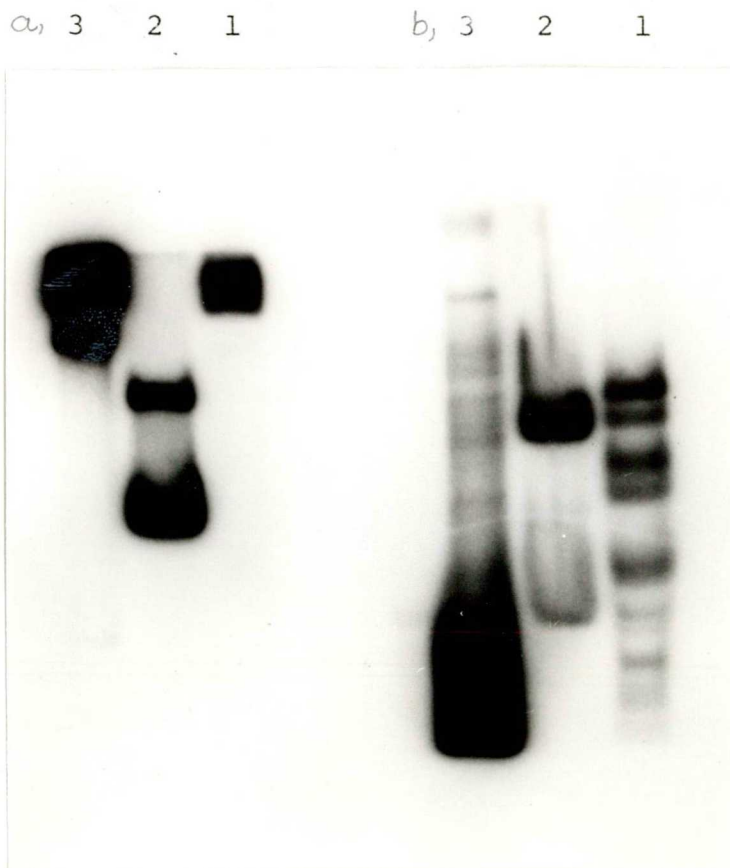
Mivel az AF100 törzsnek nincsenek természetes megacina termelő származékai, s szintén nem ismert természetes genetikai kapcsolata az AF216 törzssel, feltételezhetően plazmid DNS-ei is különböznek pl. a pBM309 DNS-től. Ezt támasztja alá a két törzs 30,9-31 MD mólsúlyu plazmidjainak eltérő restrikciós emésztési térképe is.

Az összehasonlítást a pBM309 plazmid és az AF216, AF100 törzsek plazmidjainak DNS-DNS filter hibridizációjával végeztük el /35/. A hibridizációs kísérletben a pBM309 plazmid DNS-ét  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-vel nick-transzlálással jelöltük és használtuk próbaként. A Southern technikával /47/ készített nitrocellulóz filterek at AF216, AF100 emésztetlen plazmidokat, s kontrollként a pBM309 plazmidot hordozták /7.a. ábra/, valamint ezek HindIII enzimmel nyert fragmentumait /7.b.ábra/. A hibridizálást az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük.

A pBM309 DNS nemcsak saját magával hibridizál /7.a. ábra 1. és 3. sávja/, hanem az AF100 törzs kismolekulasúlyu plazmidjaival is /7.a. ábra 2. sávja/.

Az emésztett plazmid DNS-ek hibridizációs képe mutatja /7.b. ábra/, hogy a hibridizáció nemcsak néhány DNS szakaszra specifikus, hanem szinte minden fragmentumra kiterjed.

Valószínű tehát, hogy a pBM309 plazmid a megacina termelésért felelős DNS szakaszon kívül más olyan szekvenciákat is tartalmaz, amely mind az AF216, mind az AF100 törzs plazmidjain előfordulnak.



7. ábra

- 7.a. 1. AF216 Összplazmid preparátum  
2. AF100 Összplazmid preparátum  
3. pBM309 plazmid DNS
- 7.b. 1. AF216 Összplazmid DNS HindIII restrikciós  
endonukleázzal emésztve  
2. AF100 Összplazmid DNS HindIII restrikciós  
endonukleázzal emésztve  
3. pBM309 plazmid DNS HindIII restrikciós  
endonukleázzal emésztve

Az AF100, AF216, illetve pBM309 plazmidok homológ régióinak térképezése, valamint a megacinaA termelésért felelős régió lokalizálása a pBM309 plazmid genomon további kísérleteket igényel. Az észlelt homológiák Carlton és munkatársai elméletét támogatják. További érdekes információt szolgáltathat a *Bacillus megaterium* plazmidok evolúciójával kapcsolatban a pBM309 és a plazmidmentes AF421 törzs kromoszómális DNS-e közötti esetleges homológia vizsgálata.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a megacinaA termelés plazmidon kódolt tulajdonság. A protoplasztfuzió, mint plazmidátviteli módszer is igen hatásosnak bizonyult a *Bacillus megaterium* AF216 és AF100 törzs mutánsai között. A megacinaA termelést kódoló plazmid, a pBM309, különböző mértékű instabilitást mutatott az idegen citoplazmás környezetben, s kb. 30%-os spontán eliminációját EtBr-dal történő kurálással 30-90%-ra lehetett növelni.

Az irodalomból ismert az AF216 törzs 10 plazmidjának molekulasúlya, s néhány fizikai jellemzője. Az AF100 törzs és mutánsainak plazmidjairól nem volt ezideig adat. Megállapítottuk, hogy az AF100 törzs 3 különböző méretű plazmidot tartalmaz, közülük a legnagyobb kb. 31 MD mólsúlyu, s még két kisebb molekulasúlyu plazmid DNS is jelentős mennyiségben jelen van. Az AF100 törzs különböző származékai valószínűleg az NTG mutagenézis eredményeként a két kis molekulasúlyu plazmidot elvesztették, s egyikőjük /AF421/ nem tartalmazza detektálható mennyiségben egyik plazmid molekulát sem.

Ez a törzs /AF421/ megfelelt a plazmid DNS-sel végzett protoplaszt transzformációs kísérletek céljára, mivel a transzformánsokban egyértelműen azonosítható volt a bevitt molekula.

A protoplasztfuzióval és protoplaszt transzformációval nyert megacinaA termelő klónok plazmid DNS-eit restri-

ciós emésztéssel összehasonlítottuk, s megállapítottuk, hogy szerkezetük azonos, a fúzió során nem történt DNS átrendeződés a molekulán.

A megacinA termelésért felelős plazmid molekulasúlyát durván 26-31 MD-ban állapítottuk meg, ami valószínűsítette, hogy ez az AF216 törzs 31 MD mólsúlyú plazmidjával azonos.

A pBM309 egyetlen BamHI hasítóhellyel rendelkezik, s mivel markert /bakteriocin termelés/ hordozó plazmid, alkalmas lehet mint vektor *Bacillus megaterium* törzsekben, s talán a *Bacillus* genus néhány más fajában is /pl. *Bacillus cereus*/ genetikai manipulációs kísérletekre.

Elvégeztük a pBM309 plazmid DNS-DNS filter hibridizációját az AF216, AF100 törzsek plazmid DNS-eihez, az azonos szekvenciák kimutatása céljából. Érdekes módon a plazmid mind az AF216, mint az AF100 törzs plazmid DNS-eivel jelentős azonosságot mutatott.

E nem "megacinA-specifikus" hibridizáció magyarázata azonban még további kísérleteket igényel, amelyek választ adhatnak az egyes *Bacillus megaterium* törzsek plazmidjainak evolúciójára is.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bernhard, K., Schrempf, H. and Goebel, W. /1978/  
J. Bacteriol. 133:897-903.
2. Brown, B.C. and Carlton, B.C. /1980/ J. Bacteriol.  
142:508-512.
3. Carlton, B.C. and Helinski, D.R. /1969/ PNAS USA  
64:592-599.
4. Carlton, B.C. and Smith, M.P.W. /1974/ J. Bacteriol.  
111:1201-1209.
5. Carlton, B.C. /1974/ Biochem. and Biophys. Res.  
Commun. 58:719-727.
6. Carlton, B.C. and Brown, B.J. /1979/ Plasmid 2:59-68.
7. Chang, S. and Cohen, S.N. /1979/ MGG 168:111-115.
8. Clowes, R.C. /1972/ Bacteriol. Rev. 36:361-405.
9. Currier, T.C. and Nester, E.W. /1976/ Anal. Bio-  
chemistry 76:431-441.
10. Dobritsa, A.P., Dobritsa, S.V. and Tanyasin, V.I.  
/1978/ MGG 164:195-204.
11. Donoghue, H.D. /1972/ J. gen. Microbiol. 72:473-483.
12. Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M. /1975/ Experi-  
entia 31:1028.
13. Fodor, K., Hadlaczky, G. and Alföldi, L. /1975/  
J. Bacteriol. 121:390.
14. Fodor, K. and Alföldi, L. /1976/ PNAS USA 73:2147.
15. Fodor, K., Demiri, E. and Alföldi, L. /1978/ J. Bac-  
teriol. 135:68.

16. Fodor, K. and Alföldi, L. /1979/ MGG 168:55-59.
17. Fodor, K., Rostás, K. and Alföldi, L. /1979/ In:  
Advances in Protoplast Research  
Proceedings of the 5th International Protoplast  
Symp. /Eds. Ferenczy, L. and Farkas, G.L./  
Akadémiai Kiadó and Pergamon Press, pp. 19-28.
18. Fredericq, P. /1957/ Ann. Rev. Microbiol. 11:7-22.
19. Gaál, V., Molnár, J. and Ivanovics, G. /1971/  
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 18:29-39.
20. Hadlaczky, G., Fodor, K. and Alföldi, L. /1976/  
J. Bacteriol. 125:1172.
21. Hardy, K.G. /1975/ Bacteriol. Rev. 39:464-515.
22. Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. /1974/  
J. Virol. 14:1235.
23. Hennebery, R. and Carlton, B.C. /1973/ J. Bacteriol.  
114:625-631.
24. Hirsch, P.R. /1978/ J. gen. Microbiol. 113:219-228.
25. Holland, I.B. /1961/ Biochem. J. 78:641-648.
26. Hopwood, D.A., Weight, H.M., Bibb, M.J. and Cohen, S.N.  
/1977/ Nature 268:171.
27. Hotchkiss, R.D. and Gábor-Hotchkiss, M. /1979/  
In: Advances in Protoplast Res. pp.
28. Ivanovics, G. and Alföldi, L. /1954/ Nature 174:465.
29. Ivanovics, G. and Alföldi, L. /1955/ Acta Microbiol.  
Acad. Sci. Hung. 2:275.
30. Ivanovics, G. and Alföldi, L. /1957/ J. gen.  
Microbiol. 16:552.



31. Ivanovics, G., Alföldi, L. and Lovas, B. /1957/  
Acta Microbiol. Acad. Sci, Hung. 4:295.
32. Ivanovics, G. and Nagy, E. /1958/ J. gen.  
Microbiol. 19:407-418.
33. Ivanovics, G., Alföldi, L. and Nagy, E. /1959/  
J. gen. Microbiol. 21:51-60.
34. Jacob, A.E., Douglas, G.J. and Hobbs, S.J.  
/1975/ J. Bacteriol. 121:863-872.
35. Jeffreys, A.J. and Flavell, R.A. /1977/  
Cell 12:1097-1108.
36. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. /1974/ Planta  
115:355.
37. Montero, N.I.J. and Rostás, K. /1979/ In: Abstr.  
5th International Protoplast Symp. pp. 110.
38. Nagy, E., Alföldi, L. and Ivanovics, G. /1959/  
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 6:327.
39. Nomura, M. /1967/ Ann. Rev. Microbiol. 21:257-279.
40. Novick, R., Sanchez, Rivas, C., Gruss, A. and  
Edelman, I. /1980/ Plasmid 3:348-358.
41. Ozaki, M., Higashi, Y., Saito, H., An, T. and  
Amano, T. /1966/ Biken's J. 9:201-213.
42. Radloff, R., Bauer, W. and Vinograd, J. /1967/  
PNAS USA 57:1514-1521.
43. Reeves, P. /1965/ Bacteriol. Rev. 20:24-42.
44. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and  
Berg, P. /1979/ J. Mol. Biol. 113:237-251.
45. Roberts, R.J. and Junetsu, I. /1979/ Gene. 5:1-7.

46. Schaeffer, P., Cami, B. and Hotchkiss, R.D. /1976/  
PNAS USA 73:2151-2155.
47. Southern, E.M. /1975/ J. Mol. Biol. 98:503-517.
48. Sutcliffe, J.G. /1978/ Nucl. Acids Res. 5:2721-2728.
49. Vorobjeva, I.P., Khmel, I.A. and Alföldi, L. /1980/  
FEMS Microbiology Letters 7:261-263.
50. Warren, R., Rogolsky, M., Wiley, B.B. and  
Glasgow, L.A. /1975/ J. Bacteriol. 122:99-105.