

Tézisek

a

Regulation of nopaline uptake in  
*Agrobacterium tumefaciens*

c. PhD disszertációhoz

Dr Marincs Ferenc

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ

Gödöllő

2007

## Bevezetés

A sejtbeli folyamatokat különböző mechanizmusok szabályozzák adott szinteken. Az első szint ezek közül a transzkripció szabályozása, ami a géntermékek megfelelő tér és időbeli jelenlétét biztosítja a sejtbeli folyamatokhoz. A transzkripció szabályozását DNS kötő fehérjék végzik, amelyek represszorok vagy aktivátorok lehetnek, a génexpresszióra gyakorolt hatásuktól függően. A szabályozó fehérjék kölcsönhatása specifikus DNS szekvenciákkal, amelyeket operátoroknak nevezünk, eredményezi a szabályozott promoterek és az általuk átirrt gének represszióját vagy aktiválását.

Az operátor szekvencia pozíciója a szabályozott promoterhez képest igen fontos faktor annak a mechanizmusnak a szempontjából, amellyel a szabályozó fehérje a génexpressziót befolyásolja. A represszor fehérjék általában a szabályozott promoterhez kötődnek, így fizikailag megakadályozzák a transzkripció RNS polimeráz általi megindítását. Ezzel ellentétben, az aktivátor fehérjék általában a szabályozott promoteren kívül kötődnek, így képesek kölcsönhatásba lépni az

RNS polimerázzal a transzkripció megindításához. Vannak olyan szabályozó fehérjék, amelyeknek kettős funkciójuk van és represszorként és aktivátorként is szabályozzák a génexpressziót.

A szabályozó fehérjék és operátorok közötti kölcsönhatást kisméretű szignál molekulák (amelyeket induktoroknak, korepresszornak vagy koaktivátornak is neveznek) befolyásolják. Ezek a molekulák a fehérjékkel kölcsönhatásba lépve megváltoztatják a fehérje-DNS kapcsolatot, és ezáltal befolyásolják a génexpressziót. Ezen molekulák hatása a szabályozó fehérje-DNS kötésre különféle lehet. Egyfelől befolyásolhatják a szabályozó fehérjék affinitását a DNS szekvenciához, azaz a szabályozó fehérjék ezen molekulák jelenlétében vagy hiányában vagy kötődnek illetve nem kötődnek az operátorhoz. Ez a fajta hatás előfordul mind a represszor mind az aktivátor fehérjék körében. A kettős, represszor-aktivátor funkciójú fehérjék esetében, a fehérje rendszerint kötődik az operátorhoz, akár jelen van a kisméretű szignál molekula akár nincs. A szignál molekula befolyásolhatja a kötés erősségét, vagy szerkezeti változást okozhat a fehérje-DNS komplexben.

Bármelyik hatás kapcsolóként szolgálhat a represszált és aktivált állapotok között.

Ebben a disszertációban egy kettős funkciójú, represszor-aktivátor fehérje és annak az *Agrobacterium tumefaciens* nopaline lebontás operon génexpressziós szabályozásában betöltött szerepének a vizsgálatát írom le.

Az *Agrobacterium tumefaciens* egy talajban található növénypatogén baktérium. Virulens törzsei nagyméretű, úgynevezett tumor indukáló (Ti) plazmidot hordoznak, és tumort okoznak különböző növényeken. A baktérium, a sérült növényből származó vegyületek hatására, megfertőzi a sérülés helyét. Ezek a növényi vegyületek indukálják a baktérium virulencia génjeit, amelyek termékei a Ti plazmid egy adott részét, a T-DNS-t átviszik a növényi sejtek sejtmagjába, ahol az beépül a genomba. Ezután a transzformáció után, a beépült T-DNS gének expressziója növényi hormonok túltermelését eredményezi, ami a transzformált sejtek kontrolálatlan osztódásához és ezáltal tumor kialakulásához vezet. Természetesen, a tumor kialakítása nem cél, hanem eszköz a baktérium számára ebben a

folyamatban. A tumor indukálásával a baktérium kedvező környezetet biztosít a saját túléléséhez és szaporodásához. Nevezetesen, a beépült T-DNS gének, amelyek expresszálódnak a növényi genomban, különleges molekulák szintézisét irányítják. Ezek a molekulák, amelyeket összefoglalóan opinoknak nevezünk, szerves savak és aminosavak, vagy cukrok és aminosavak vegyületei, és szén és nitrogén forrásként szolgálnak a tumort indukáló baktérium számára. Ebben a viszonylag tápanyagban gazdag közegben a baktérium szaporodni képes és átadja a Ti plazmidot más baktérium egyedeknek.

Az opinok lebontását irányító gének szintén a Ti plazmidon találhatóak, de a T-DNS-en kívül és ezért nem kerülnek át a növényi genomba. Expressziójukat az az opin indukálja, amelyet a fertőző baktérium által létrehozott tumor termel.

Nopalin egy olyan opin, amely azon tumorokban képződik, amelyeket nopalin típusú Ti plazmidot, pl. TiT37, hordozó *Agrobacterium* törzsek okoznak.

Munkám célkitűzése az volt, hogy a génexpresszió szabályozását vizsgáljam a nopalin lebontásáért felelős

operonban, *Agrobacterium tumefaciens* pTiT37-es Ti plazmidján.

Munkámat a DSIR/AgResearch kutatóintézetben Palmerston North-ban, Új Zélandon végeztem, 1989 és 1995 között, és négy elsőszerzős publikációban közöltem, amelyek a tézisek végén vannak felsorolva.

### **Anyag és módszer**

Munkám során különböző molekuláris megközelítéseket és technikákat használtam.

Plazmidok konstruálásához szükség volt nukleinsav izolálására, klónozásra, hely-specifikus mutagenézisre, szekvenálásra, PCR-ra és jelzőgén fúziók építésére, amit vagy standard, vagy a közölt cikkekben leírt módszerekkel végeztem.

Spektrofotometriát, agaróz gél elektroforézist, topoizomer agaróz gél elektroforézist, denaturáló akrilamid fehérje elektroforézist és enzimméréseket alkalmaztam nukleinsavak és fehérjék vizsgálatára a publikált cikkekben leírtak szerint.

Fehérje-DNS kölcsönhatásokat gél retardációs és DNaseI footprinting módszerekkel tanulmányoztam.

## Eredmények

- A TiT37 plazmid *nocR* génjét klónoztam, szekvenáltam és *E. coli*-ban expresszáztattam
- Szekvencia analízissel kimutattam, hogy a NocR fehérje egy helix-turn-helix típusú, DNS kötő fehérje, amely a bakteriális LysR transzkripció aktivátorok családjába tartozik
- Gél retardációval és DNaseI footprintinggel a NocR fehérje kötőhelyét a *nocR* promoterhez lokalizáltam az ellentétes irányban átíródó *nocR-nocB* promoter régió belül, relatíve nagy távolságra a *nocB* promotertől, amelyet funkcionálisan és szekvencia analízissel azonosítottam
- Szekvencia analízissel kimutattam, hogy a NocR fehérje kötőhelyén belül egy CATGN<sub>4</sub>CATG tandem palindrom szekvencia lehet a NocR fehérje operátora, és hogy az operator átfed egy 18 bp-os váltakozó purin-pirimidin szekvenciával és egy a gyrase fehérje kötőhelyével nagyfokú homológiát mutató szekvenciával

- A *nocR* promoterből helyspecifikus mutagenézissel eltávolítottam az operátor szekvenciát és gél retardációval kimutattam, hogy az operátor szekvencia szükséges a NocR fehérje kötődéséhez
- *gusA* és *luc* riporter génfúziókkal kimutattam, hogy a NocR fehérje szabályozza saját szintézisét és az ellentétes irányban átíródó *nocB* gén expresszióját
- Ugyanezekkel a génfúziókkal ugyancsak kimutattam, hogy az operátor hiánya és a *nocR* gén transzkripciója önmagában is befolyásolja a *nocB* gén expresszióját még a NocR fehérje hiányában is
- Topoizomer analízissel kimutattam, hogy az operátor szekvencia hiánya befolyásolja egy plazmid supercoil állapotát
- Egy újfajta, B-Z DNS átalakuláson és lokális supercoil változáson alapuló, távszabályozós transzkripció modellet írtam le



**A PhD disszertáció a következő referált  
cikkeken alapszik:**

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1993): Nopaline causes a conformational change in the *NocR* regulatory protein-*nocR* promoter complex of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiT37. *Mol. Gen. Genet.* 241: 65-72.

**Marincs, F.\*** and White, D.W.R. (1994): The *NocR* repressor-activator protein regulates expression of the *nocB* and *nocR* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 244: 367-373.

**Marincs, F.\*** and White, D.W.R. (1995): Divergent transcription and a remote operator play role in control of expression of a nopaline catabolism promoter in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.* 270: 12339-12342.

**Marincs, F.\*** and White, D.W.R. (1996): Regulation of gene expression at a distance: the hypothetical role of regulatory protein-mediated topological changes of DNA. *FEBS Letters* 382: 1-5.

\* csillag jelzi a levelező szerzős közleményeket

## **Konferencia közlemények a témából:**

### **Előadások (meghívott előadóként):**

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1991): Regulation of *Agrobacterium* opine catabolism gene expression. 1st Annual Queenstown Molecular Biology Meeting, Queenstown, New Zealand.

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1992): DNA topology controls expression of the *nocB* gene in *Agrobacterium tumefaciens*. Meeting on Molecular Genetics of Bacteria and Phages, Cold Spring Harbor, NY, USA.

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1993): Regulation of nopaline uptake in *Agrobacterium tumefaciens*: in vivo and in vitro studies. Joint Annual Conference of the New Zealand Microbiological Society and the New Zealand Society for Biochemistry and Molecular Biology. Palmerston North, New Zealand.

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1994): Effect of upstream sequences on expression of a bacterial promoter. 4th Queenstown Molecular Biology Meeting, Queenstown, New Zealand.

### **Előadások (társszerzőként):**

White, D.W.R. and **Marincs, F.** (1991): Molecular interactions in the activation of *Agrobacterium* opine catabolism gene expression. Australasian Gene Mapping and Molecular Genetics Symposium, Dunedin, New Zealand.

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1992): DNA topology controls expression of the *nocB* gene in *Agrobacterium tumefaciens*. 2nd Annual Queenstown Molecular Biology Meeting, Queenstown, New Zealand.

### **Poszterek:**

White, D.W.R., Pritchard, M. and **Marincs, F.** (1990): Genetic and sequence analysis of *Agrobacterium* opine catabolism genes. Molecular Genetics Symposia, Palmerston North, New Zealand.

**Marincs, F.** and White, D.W.R. (1994): Regulation of the nopaline catabolism genes of pTiT37 in *Agrobacterium tumefaciens*. 7th International Symposia on Molecular Plant-Microbe Interactions, Edinburgh, Scotland.

**Marincs, F.,** Dudas, B. and White, D.W.R. (1994):  
Activation of an *Agrobacterium* nopaline catabolism  
promoter *in planta*. 4th Queenstown Molecular Biology  
Meeting, Queenstown, New Zealand.