B3470

A RHIZOBIUM MELILOTI *fix-14* RÉGIÓJÁBAN KÓDOLT FEHÉRJÉK A SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉSBEN IS SZEREPET JÁTSZÓ *C*-TÍPUSÚ CITOKRÓMOK ÉRÉSI FOLYAMATAIBAN VESZNEK RÉSZT

PhD értekezés

Készítette:

Kereszt Attila

MTA Szeged Biológiai Központ

Genetikai Intézete

Témavezető:

Dr. Kondorosi Ádám

Szeged, 1997

TARTALOM

	oldal
ELŐSZÓ	3
1. BEVEZETÉS	4
1.1. A szimbiotikus nitrogénkötés	5
1.1.1. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása	6
1.1.2. A légköri nitrogén redukciója	12
1.1.3. A reduktánsok és az ATP előállítása a bakteroidokban	15
1.1.3.1. Tápanyagellátás és felhasználás a bakteroidokban	16
1.1.3.2. A szimbiotikus gyökérgümő mikrokörnyezete	18
1.1.3.3. A bakteriális elektrontranszport-láncok felépítése, működése és funkciója	19
1.1.3.4. A szimbiotikus körülmények között funkcionáló terminális oxidációs lánc	23
1.2. Kutatási előzmények	25
2. CÉLKITŰZÉSEK	28
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok	29
3.2. Mikrobiológiai eljárások	30
3.3. Rekombináns DNS-technikák	31
3.4. A DNS bázissorendjének meghatározása	33
3.5. Növényi teszt	33
3.6. "Respirációs" nitrát-reduktáz aktivitás kimutatása	34
3.7. Citokróm *c* oxidáz teszt	34
3.8. In vivo differencia-spektroszkópia	34
3.9. Fehérjeizolálás	35
3.10. A fehérjeminták gélelektroforézise és specifikus festése	35
4. EREDMÉNYEK	37
4.1. A *fix-14* régióban bekövetkező mutációk a *c*-típusú citokrómok hiányát eredményezik	37
4.2. A *c* -típusú citokrómok bioszintéziséhez szükséges gének vizsgálata	41
4.2.1. A *fix-14* régió génjeinek szubklónozása és szekvencia analízise	41
4.2.2. A *fix-14* régióban kódolt fehérjék számítógépes analízise	47
4.2.2.1. A *cycH, J, K,* és *L* gének membrán-kötött és periplazmatikus fehérjéket határoznak meg	48
4.2.2.2. A *cycHJKL* géncsoport által kódolt proteinek bakteriális és organellum eredetű fehérjékhez hasonlítanak	50
5. MEGVITATÁS	58
5.1. A mutánsok pleiotróp fenotípusa	58
5.2. A *c*-típusú citokrómok	61
5.3. A *fix-14* régióban kódolt proteinek lehetséges funkciója, a *c*-típusú citokrómok érésének modellje	62
5.4. A téma jövője	66
6. ÖSSZEFOGLALÁS	68
7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	69
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	79
9. IRODALOMJEGYZÉK	81

ELŐSZÓ

A dolgozat anyagát képező kísérleteket, melyek eredményeit hazai és nemzetközi konferenciákon. illetve nemzetközi folyóiratban tettük közzé, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Nitrogénkötési Csoportjában végeztem. Az itt leírt kutatások a csoport, s ezen belül jómagam munkájának csak egy szűk szeletét fedik le, ugyanis bár a különböző témákat a szimbiotikus nitrogénkötő gümő kialakulása és működése címszó jól összefoglalja, azonban egy PhD disszertáció szűkebb keretei között csak egy adott, jelen esetben a szívemhez legközelebb álló téma fejthető ki.

Köszönettel tartozom a Genetikai Intézet jelenlegi és volt igazgatóinak, Dr Raskó Istvánnak és Dr Alföldi Lajosnak, hogy munkám nemcsak lehetővé tették az általuk vezetett intézményben, hanem bíztató figyelemmel is kísérték.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr Kondorosi Ádámnak, hogy meghívott az általa vezetett kutatócsoportba, ahol kritikai észrevételeivel, jó tanácsaival segítette munkámat, és ami a legfontosabb, bízott bennem a sikertelen időszakokban is.

Külön köszönet illeti:

-Dr Dusha Ilonát a dolgozat kritikus szemmel való elolvasásáért, ha a mű nem sikerült jobban, az nem az ő hibája

-Lehőczné Sárai Zsókát a laborban nyújott lelkiismeretes, precíz segítségéért

-Kiss Ernőt és Oláh Boglárkát, hogy mindig mindenről, lehetett velük beszélni, mert meghallgattak.

Hálás vagyok a Nitrogénkötő Csoport többi tagjának a jó hangulatért, barátságukért, valamint azért, hogy ki "kenyérrel", ki "korbáccsal", de bíztatott, főleg ezen írásmű elkészítésére.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom lelki segítségét valamint türelmét, hogy elviselték a kutatói életforma őrületét, ugyanis ők megértették, hogy ez "az őrület kéj, de ezt a kéjt csak az őrültek érzik".

1. BEVEZETÉS

Az élő szervezetek leggyakrabban előforduló építőkövei (C, H, N, O, P, S) közül a nitrogén a földkéreg elemeinek csupán 0.005 tömegszázalékát teszi ki, míg a légkörben az összes gáz 78.1%-át alkotja. A hármas kötésű nitrogén gázt azonban az élőlények túlnyomó többsége, így egyetlen eukarióta szervezet sem képes hasznosítani. Bizonyos prokarióta, úgynevezett diazotróf mikroorganizmusok viszont rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, hogy a légköri nitrogént meg tudják kötni, azaz más élőlények által is felhasználható redukált nitrogénvegyületet, ammóniát állítanak elő, ami aztán biokémiai folyamatok sorozatán keresztül beépül a fehérjékbe, nukleinsavakba és egyéb vegyületekbe. A diazotróf mikroorganizmusok egy része szabadon élve (pl. *Klebsiella*, *Azospirillum*), míg más részük csak magasabbrendű növényi partnerrel szimbiózisban (pl. *Rhizobium*) képes a levegő nitrogénjének megkötésére (Allen és Allen, 1981). A biológiai úton redukált nitrogén mennyiségét évente 100-120 millió tonnára becsülik, amely körülbelül 60%-a az évente a Földre kerülő kötött nitrogénnek (Peoples és Craswell, 1992). A maradékból mintegy 25%-kal részesedik az ipari termelés, míg a többi villámlás, ultraibolya sugárzás, és más légköri jelenségekkel energizált fizikai-kémiai folyamatok hatására képződik. Ebből következik, hogy a nitrogénkötők szerepe alapvető a bioszféra nitrogén-körforgásának fenntartásában.

A *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Azorhizobium* (*Rhizobiaceae*) fajok és a pillangós virágú növények (*Leguminosae*) között kialakuló szimbiotikus kapcsolat különösen hatékony, hiszen pl. a *R. meliloti* - lucerna szimbiózisban az egy év alatt hektáronként megkötött nitrogén mennyisége körülbelül 300 kg, amely két nagyságrenddel felülmúlja a szabadon élő diazotrófok teljesítményét (Philips, 1980).

Minthogy a mezőgazdaságban a termőföldek nitrogén-utánpótlására széleskörűen alkalmazott műtrágyák előállításához sok energia szükséges, valamint a túlzott műtrágyázás a talajt leronthatja és a környezetet szennyezi, ezért előtérbe került a

biológiai, s ezen belül a szimbiotikus nitrogénkötés hatékonyságának fokozása, illetve kiterjesztése más, gazdaságilag fontos növényekre. E jövőbeli célok érdekében ismernünk kell a szimbiózis kialakulásának, működésének molekuláris biológiai és fiziológiai hátterét, azokat a bakteriális és növényi géneket, fehérjéket, amelyeknek szerepük van a baktérium és a növény együttműködésében. A távlati gazdasági és környezetvédelmi lehetőségeken túl a szimbiotikus kapcsolatok vizsgálata számos érdekes elméleti kérdésre (pl. a két, rendszertanilag távolálló szervezet közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusa, egy új növényi szerv organogenezise) is választ adhat. Ezek a kutatások több mint két évtizede folynak a világ különböző laboratóriumaiban, így az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Nitrogénkötési csopotjában is, mely a *R. meliloti* és a lucerna (*Medicago sativa*) között kialakuló szimbiózist tanulmányozza.

1.1. A szimbiotikus nitrogénkötés

A szabadonélő nitrogénfixálókkal szemben a talajlakó *Rhizobium*ok nem normális életterükben, hanem csakis egy speciális mikrokörnyezetben (lásd később!), növényi sejtek belsejében endoszimbiontaként végzik a nitrogén redukcióját. A szimbiotikus nitrogénkötés színhelye az egyetlen más növényi szervvel sem homológ gyökérgümő. Kialakulásához a partnerek kölcsönös felismeréséből, valamint több kommunikációs és fejlődési lépésből álló bonyolult folyamat vezet. A kialakult gümőkben a *Rhizobium*ok endoszimbiotikus formái, a *bakteroidok* végzik a légköri nitrogén redukálást, és a redukált nitrogén fejében gazdanövényük a fotoszintézis során előállított tápanyagokkal látja el őket.

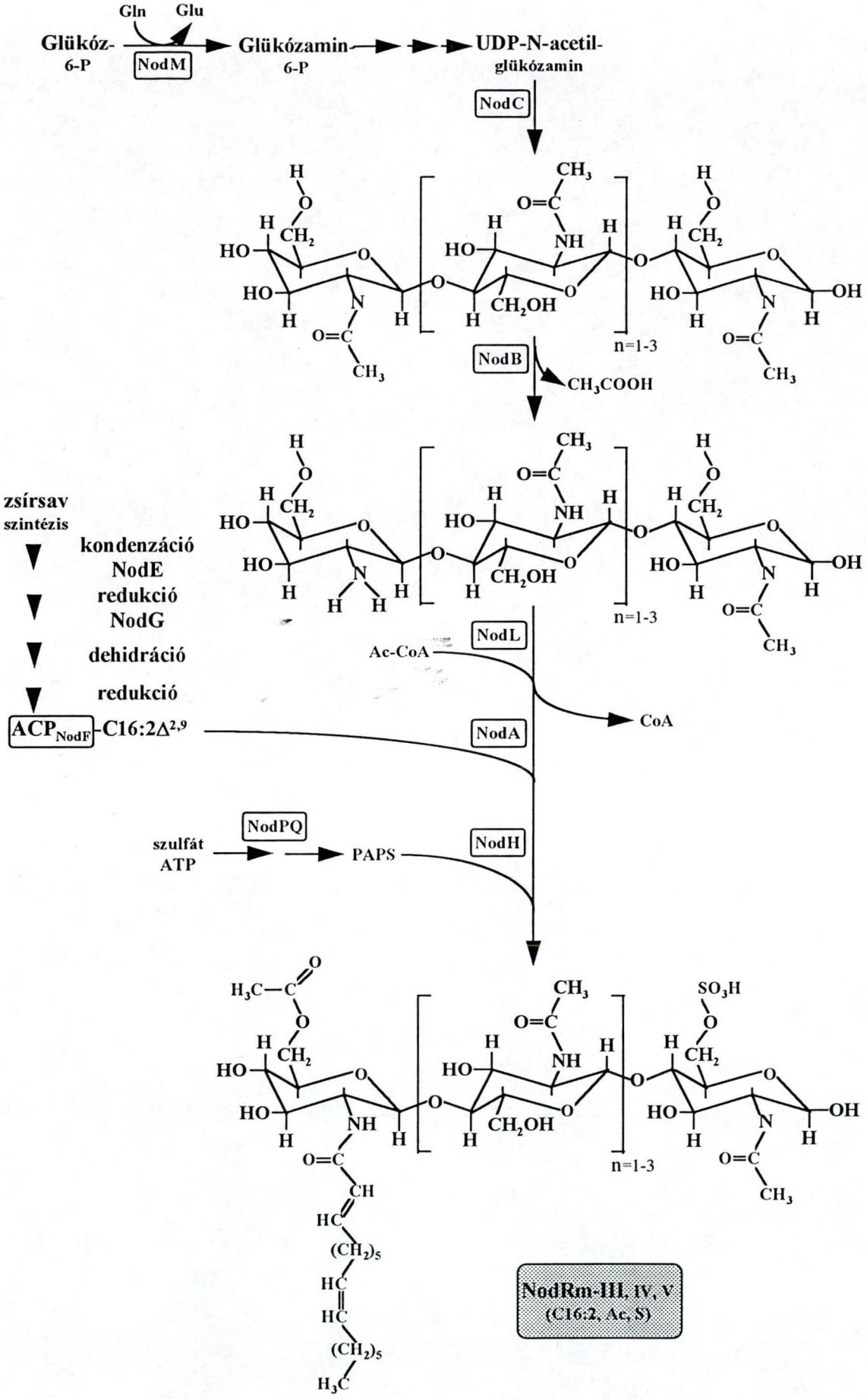
A szimbiózis kialakulását mindkét partner részéről nagyszámú gén irányítja. A növényi partnerben megjelenő gümőspecifikus fehérjék, a nodulinok termeléséért az ún. nodulin-gének a felelősek. A korai nodulinok a légköri nitrogén redukciójának megkezdése előtt jelennek meg, így a baktériumok infekciójában és a gümő fejlődésében játszhatnak

szerepet. Késői nodulinokat a baktériumokkal elárasztott fejlődő vagy érett gümőkben mutattak ki. Feladatuk a nitrogénkötéshez szükséges fiziológiai környezet biztosítása valamint az endoszimbionta által termelt kötött nitrogén asszimilációja lehet (Mylona és mtsai, 1995).

A szimbiózis során szerepet játszó bakteriális géneket két nagy csoportba sorolhatjuk: A gümőképzési (nodulációs, *nod*) gének a szimbiotikus gümő fejlődésének kezdeti lépéseit irányítják, hibájuk esetén vagy nem jönnek létre gümők, vagy csak késleltetve, illetve kisebb számban. A fixációs (*fix*) gének a gümő fejlődésének és működésének későbbi szakaszaiban játszanak szerepet, mutációjuk esetén kialakulnak ugyan gümők, azonban nitrogénkötés nem folyik bennük. A *fix* gének egy csoportja, a nitrogénfixációs, vagy *nif* gének, a nitrogén redukciójához szükséges fehérjéket kódolja. E gének megfelelői a szabadon élő nitrogénkötő baktériumokban is megtalálhatók.

1.1.1. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása

A *Rhizobium*ok és a pillangós virágú növények között kialakuló kapcsolat specifikus, azaz egy adott baktériumfaj csak bizonyos növényfajokkal létesít szimbiózist. Mindazonáltal a specifitás mértéke különböző: egyes *Rhizobium* fajok, mint például a *R. meliloti*, melynek csak a *Medicago*, *Melilotus*, és *Trigonella* családokba tartozó fajok a gazdanövényei, szűk gazdaspecifitásúak; más fajok ezzel szemben széles gazdaspecifitásúak, pl. a *R. sp.* NGR234 a pillangósok több mint 70 családjába tartozó növényfajok gyökerén hoz létre gümőt. A gazdaspecifitást, azaz a partnerek kölcsönös felismerését jelmolekulák biztosítják. Az első jelet a növények küldik a nem obligát szimbionta baktériumok felé, a gyökerek által kibocsájtott többféle flavonoid típusú



1. ábra. A Nod faktorok szerkezete és bioszintézise *R. melilotiban*

vegyület formájában. Ezt a jelet a baktériumokban a folyamatosan átíródó, egy vagy több *nodD* gén terméke érzékeli (Györgypál és mtsai, 1991a). A különböző NodD fehérjék, melyeknek elsősorban a C-terminális része tér el egymástól és feltételezett ligand-kötő régiója az emlős nukleáris receptorokhoz hasonló, különböző flavonoidokat ismernek fel: pl. *R. meliloti*ban a három különböző funkcionális NodD kópia flavonoid-felismerése részben eltérő (Györgypál és mtsai, 1988; 1991b; 1991c). A helix-turn-helix DNS-kötő motívumot tartalmazó NodD fehérjék, melyek a *nod* gének transzkripciós startpontja előtt található, erősen konzerválódott cisz-regulátor DNS-szakaszhoz, a *nod-box*hoz kapcsolódnak (Rostás és mtsai, 1986), a megfelelő növényi inducerek jelenlétében aktiválják a *nod* (*nol*, *noe*) gének transzkripcióját. A *nod* gének termékei egy újabb jelmolekula-család, a lipo-chitooligoszacharid jellegű Nod faktorok szintézisében vesznek részt (Lerouge és mtsai, 1990; Schultze és mtsai, 1992). A közös, azaz minden *Rhizobium* fajban megtalálható, és egymást funkcionálisan helyettesíteni képes Nod proteinek (NodA, B, C, M) a prekurzorokat és a chitooligoszacharid vázat hozzák létre (Schultze és Kondorosi, 1996; 1. ábra). Az ún. gazdaspecifitási *nod* gének termékei a cukorlánc nem-redukáló (pl. NodEFG: N-acil, NodL: O-acetil), illetve redukáló (pl. NodPQH: O-szulfil) végein található módosítások kialakításáért felelősek.

A Nod faktorok hatására két jól megfigyelhető változás következik be a növény gyökerén (Dudley és mtsai, 1987) (2. ábra): (i) Egyrészt a gyökér belsejében egyes kéregsejtek osztódásnak indulnak, kialakul a gümőmerisztéma, amely létrehozza a gümő szöveteit. A merisztéma működése alapján kétféle gümőtípust különböztetünk meg: a determinált gümőkben (ilyen indukálódik a legtöbb trópusi pillangós gyökerén) a merisztéma csak meghatározott ideig működik, míg a mérsékeltövi növényekre jellemző indeterminált gümőkben a merisztéma működése folyamatos. (ii) Másrészt a gyökérszőrök deformálódnak, Rhizobiumok jelenlétében meg is görbülnek, és körülveszik a megtapadt baktériumokat. Meg kell jegyeznünk, hogy a Nod faktorokra csak bizonyos kortikális sejtek fogékonyak: lucernában, bükkönyben, borsóban főleg azok, amelyek a gyökér

központi hengerének, a sztélének az osztódó protoxilém elemekkel ellentétes oldalán találhatók. Ezt a fogékonyságot valószínűleg a gyökér központi hengerében, a protoxilém által termelt ún. sztéle-faktor, mely kémiai szerkezetét tekintve uridin, koncentráció-grádiense biztosítja (Smit és mtsai, 1993). A fogékony, a sejtciklus G0/G1 fázisában nyugvó sejtekben a Nod faktorok indukálják a sejtciklus (re)aktiválásában szerepet játszó fehérjék, pl. a Cdc2 és a mitotikus ciklinek génjeit (Savoure és mtsai, 1994; Yang és mtsai, 1994). Az indeterminált gümőkben a kortex belső részében levő sejtek ezek után újra belépnek a sejtciklusba, és a létrejövő osztódó szövet, a gümőmerisztéma létrehozza a gümő sejtjeit. A kéreg külső sejtjei ezzel szemben csak morfológiai változáson esnek át, de nem lépnek be a sejtciklusba, és nem osztódnak. A sejtek magjai centrális helyzetbe vándorolnak, a mikrotubulusok valamint a citoplazma átrendeződnek, és sugarasan elrendeződött citoplazmatikus hidakat hoznak létre (Kijne, 1992). Ezeken a preinfekciós fonalaknak nevezett citoplazmatikus hidakon haladnak át azok a csőszerű folyosók, az infekciós fonalak, melyeken keresztül a baktériumok bejutnak a gümő sejtjeibe (Van Brussel és mtsai, 1992). Az infekciós fonalak kialakulása a gyökérszőr görbületében, a baktériumok megtapadási helyénél kezdődik. A növényi sejtfal hidrolizálódik, a sejtmembrán betüremkedik, és a betüremkedésben új sejtfal rakódik le. Az ily módon kialakuló és a gümőmerisztéma felé növő infekciós fonalban (2. ábra) a sejtfal struktúrája nagyon hasonló egy normál sejt sejtfalához, azonban bizonyos nodulinok beépülése sajátos tulajdonságokkal ruházhatja fel.

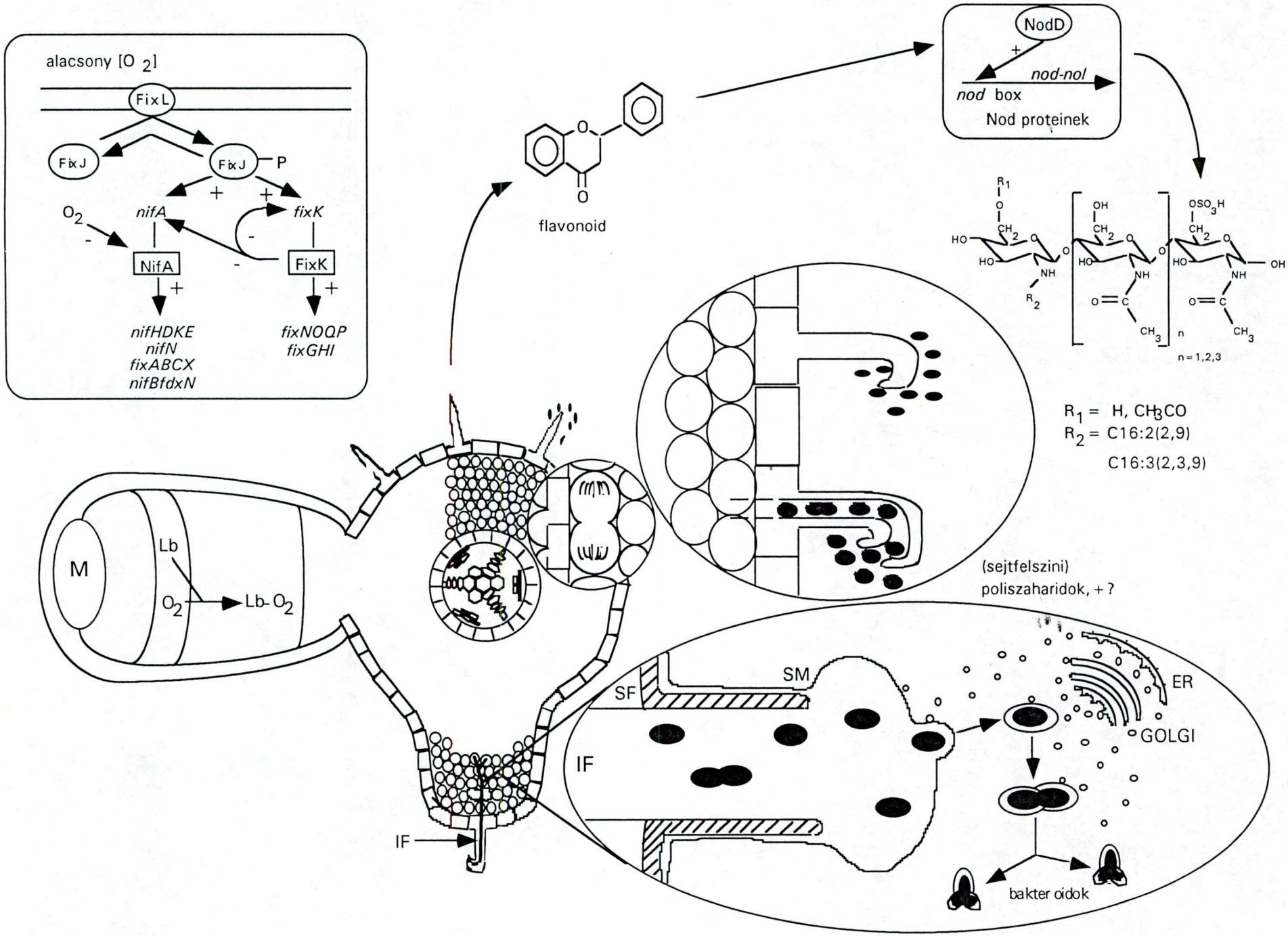
Tisztított Nod faktorok képesek kiváltani a gyökérszőrök deformációját, valamint a preinfekciós fonalak és a gümőmerisztéma kialakulását, azonban az infekciós fonalak létrejöttéhez osztódó baktériumok jelenléte is szükséges (Van Brussel és mtsai, 1992). Mi több, baktérium *fix* mutánsok vizsgálatával megállapították, hogy számos gén működése elengedhetetlen az infekció illetve az infekciós fonal kialakulása során (Putnoky és mtsai, 1988). Ezek egy része valószínűleg a speciális növényi környezethez való alkalmazkodásban (pl. ozmotikus és pH adaptáció) játszik szerepet, más részük pedig

sejtfelszíni poliszacharidok termelésében vesz részt. Általánosságban elmondható, hogy a determinált gümőket indukáló fajok felszínén a lipopoliszacharidokra (LPS-ekre), míg az indeterminált gümőket létrehozó baktériumok felszínén az exopoliszacharidokra (EPS-ekre) van szükség (Kannenberg és Brewin, 1994). Munkacsoportunk kimutatta, hogy *R. meliloti*ban az EPS-eket helyettesíteni képes egy sejtfelszíni antigén, amely az *Escherichia coli* kapszuláris poliszacharidjaihoz, a II-es típusú K antigénekhez hasonló (Putnoky és mtsai, 1990; Petrovics és mtsai, 1993). A feltételezések szerint ezek a poliszacharidok egyrészt védelmet nyújthatnak a növényi védekezési mechanizmusok ellen vagy elfedve azokat a sejtfelszíni struktúrákat, amelyek elicitorként hathatnak, vagy represszálhatják a védekezésben szerepet játszó géneket. Másrészt aktiválhatnak olyan géneket, melyek az infekciós fonal illetve a gümő fejlődésében vesznek részt. Az, hogy a sejtfelszíni poliszacharidok ezen feltételezett funkciói közül melyik (illetve melyek) valósul(nak) meg, ma még egy nem eldöntött kérdés.

A többszörösen elágazó infekciós fonalban a baktériumok folyamatosan osztódnak, és a növényi sejtek citoplazmájával történő közvetlen érintkezés nélkül eljutnak a gümő belsejébe (Turgeon és Bauer, 1982). Ott az endocitózishoz hasonló folyamat útján a növényi eredetű, ún. peribakteroid membránba "csomagolva" bekerülnek a gümősejtek citoplazmájába (Basset és mtsai, 1977; Verma, 1992; 2. ábra). További osztódásuk leáll, és számos egyéb változás következtében átalakulnak a *Rhizobium*ok endoszimbiotikus

---

2.ábra. (következő lap) A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának folyamata. A szövegben leírt fejlődési lépések a rajzon az óramutató járásával megegyező irányban követik egymást.


alacsony [O 2]
FixL
FixJ
FixJ
P
+
+
O2
-
nifA
fixK
-
-
NifA
FixK
+
+
nifHDKE
nifN
fixABCX
nifBfdxN
fixNOQP
fixGHI
flavonoid
NodD
+
nod-nol
nod box
Nod proteinek
R1
R2
n = 1,2,3
R1 = H, CH3CO
R2 = C16:2(2,9)
C16:3(2,3,9)
M
Lb
O2
Lb-O2
IF
SF
SM
IF
ER
GOLGI
(sejtfelszini)
poliszaharidok, + ?
bakter oidok

formáivá, melyeket bakteroidoknak nevezünk. Időközben a gümőmerisztéma működése révén kialakult növényi sejtek differenciálódnak, és egy struktúrált, többféle típusú sejtet tartalmazó szerv jön létre. E szervben a fertőzött és fertőzetlen sejtekből felépülő központi szöveteket szállítónyalábokat tartalmazó parenchima veszi körül. Az indeterminált gümőkben a központi szöveteket 5 zónára lehet felosztani (Vasse és mtsai, 1990): A merisztémát egy prefixációs zóna követi, ahol lejátszódik az infekció folyamata. Az interzónában kezdődik meg, és a fixációs zónában végig folytatódik azoknak a géneknek az expressziója, melyek terméke szükséges a légköri nitrogén redukciójához. A nitrogénkötési zónában sejtenként többezer bakteroid végzi a levegő nitrogénjének redukálását, melynek energiaforrásául a gazdanövény által a fotoszintézis során előállított tápanyagok szolgálnak. A legöregebb sejteket tartalmazó öregedési zónában a bakteroidok elvesztik funkcióképességüket és degradálódnak.

A gümő belsejében a nitrogénredukciót katalizáló nitrogenázt illetve a működéséhez szükséges egyéb fehérjéket kódoló gének expresszióját két transzkripciós faktor szabályozza: az RpoN σ-faktorral együttműködő NifA, valamint a FixK (2. ábra). A NifA fehérje aktivitása két szinten is az O_2-koncentráció függvénye: egyrészt a fehérje oxigén-érzékeny (Krey és mtsai, 1992), másrészt a *nifA* gén transzkripcióját, ahogy a *fixK* génét is, mikroaerob körülmények között a FixJ aktivátor indukálja. A FixJ egy kétkomponensű szenzor-aktivátor rendszer tagja, melyben az alacsony O_2-koncentrációt a FixL hemoprotein érzékeli, ami foszforilálja és így aktiválja a FixJ transzkripciós aktivátort (David és mtsai, 1988; Batut és mtsai 1989).

A növénybe a kötött nitrogén ammónia formájában transzportálódik és ott aminosavakba, elsősorban glutaminba épül be, majd eljut a növény legkülönbözőbb anyagcsere útjaiba (Schubert, 1986). A nitrogénellátás szimbiotikus úton való biztosítása a növény szempontjából nem tekinthető olcsó eljárásnak, mert a különböző becslések szerint 1 gramm nitrogén megkötéséhez kb. 5-10 gramm szénre van szükség (Phillips, 1980), mely egyrészt a nitrogénredukcióhoz szükséges reduktánsok és ATP előállítására

fordítódik, másrészt (pl. glutamin, α-ketoglutársav) az ammónia szerves vegyületekbe történő beépülésének, azaz asszimilációjának szénváz-szükségletét biztosítja.

1.1.2. A légköri nitrogén redukciója

A nem szerves vegyületekbe beépített nitrogén bármilyen formában is áll az élő szervezet rendelkezésére - akár mint N_2, akár mint NO_3^- - közvetlenül csak ammónia formájában használható fel, melyben a nitrogén oxidációs száma (-3) ugyanaz mint az aminosavakban. A korlátlanul és szabadon hozzáférhető, a légkör mintegy 80%-át kitevő dinitrogén fixált nitrogénné való átalakítását azonban csak rendkívül energiaigényes abiotikus és biológiai folyamatok révén lehet megvalósítani. A nitrogéngáz csaknem teljes mértékben inert, ugyanis bár a nitrogén redukciója ammóniává termodinamikailag kedvező, azaz szabadenergia csökkenéssel járó folyamat, azonban a reakció rendkívül nagy aktiválási energia befektetését igényli. Ennek az energiának a nagyságát jól érzékeltetik az ammónia ipari méretekben történő előállításának körülményei. A Haber-Bosch-féle katalitikus nitrogénfixációs eljárás során a légköri nitrogént és a hidrogéngázt mintegy 300-500 °C hőmérsékleten, 200 atmoszféra nyomáson, katalizátor - általában nikkel, vagy vas- és aluminium-oxid - felett áramoltatják át.

A biológiai nitrogénkötés ezzel szemben a Föld légkörének hőmérsékletén és nyomásán játszódik le, ahol a két nitrogénatomot összetartó kötések felbontását a nitrogenáz enzimrendszer katalizálja (Kim és Rees, 1994). Az enzimrendszert két fémtartalmú komponens építi fel: az egyik vasat (Fe-fehérje), míg a másik vasat és molibdént tartalmaz (MoFe-fehérje). Molibdén hiányában bizonyos fajokban (pl *Azotobacter*, *Clostridium*, viszont a *Rhizobiumok*ban nem) a konvencionális nitrogenázhoz hasonló, a molibdén helyett vanádiumot vagy vasat tartalmazó nitrogenáz rendszer szintézise indukálódhat. A körülbelül 60000 Da molekulatömegű Fe-fehérje két azonos, a *nifH* gén által kódolt alegységből épül fel, melyek között az összeköttetést a négy-négy vas és kén atomot

tartalmazó úgynevezett vas-kén (4Fe-4S) csoport biztosítja. A *nifD* és *nifK* gének által kódolt proteinek $\alpha_2ß_2$ összetételű tetramerje alkotja a durván 240000 Da molekulatömegű MoFe-fehérjét. A MoFe-fehérjével asszociáltan kétféle fémtartalmú prosztetikus csoport található: a FeMo-kofaktort tekintik a nitrogénredukció helyének, míg az úgynevezett P-csoport az elektronoknak a Fe-fehérjéről a FeMo-kofaktorra történő szállításában játszhat szerepet. Az enzimrendszert felépítő metalloproteinek, melyek eredete még a reduktív légkör 2 milliárd évvel korábbi időszakára nyúlik vissza, rendkívül oxigén-érzékenyek, O_2 jelenlétében, valószínűleg kofaktoraik oxidálódása miatt, irreverzibilisen inaktiválódnak.

A szubsztrát redukálása, azaz a nitrogenáz működése során három alapvető elektrontranszfer reakció játszódik le (Kim és Rees, 1994):

(i) A Fe-proteint elektronszállítók, mint pl. flavodoxin vagy ferredoxin redukálják.

(ii) Az elektronok egy ATP-függő folyamat révén, elektrononként legalább két ATP hidrolízise árán a Fe-proteinről a MoFe-proteinre kerülnek. Az elektronoknak a fehérjék, illetve a kofaktorok közötti mozgásában a két fehérje asszociálódásának és a Fe-protein konformációváltozásainak van szerepe. ATP bekötődésének hatására a Fe-protein úgy változtatja meg konformációját, hogy a MoFe-proteinnel asszociálódik és 4Fe-4S csoportja a másik fehérje P-csoportjának közelébe kerül. Az ATP hidrolízisét követően lejátszódik az elektrontranszfer, majd az ADP és a foszfát-ion leválik, és helyreáll az eredeti konformáció.

(iii) A harmadik elektrontranszfer a MoFe-proteinen belül, a fehérje aktív helyéhez kötött szubsztráthoz történik. Ennek módja ma még nem ismert, de feltételezik, hogy az elektronok páronként jutnak a nitrogénhez, s az három lépcsőben redukálódik ammóniává. A jelenlegi elképzelések szerint a nitrogéngáz a FeMo-kofaktor közepébe kötődik be, ahol a gyenge Fe-Fe kölcsönhatásokat több Fe-N kölcsönhatás válthatja fel. Ezen Fe-N kölcsönhatások eredményeképp a molekuláris nitrogén hármas kötéseinek gyengülniük kell, csökkentve ezzel a dinitrogén redukciójához szükséges aktiválási energiát.

Az optimális körülmények között lejátszódó nitrogén-redukciót az alábbi egyenlettel lehet leírni:

$$N_2+8H^++8e^-+16ATP \rightarrow 2NH_3+H_2+16ADP+16P_i.$$

Amint látható, a nitrogenáz nemcsak a nitrogéngáz ammóniává történő redukálását katalizálja, hanem a protonokat is hidrogéngázzá redukálja. Ez utóbbi reakció, úgy tűnik, hogy az ammónia képződésének kötelező velejárója. Az enzimrendszer ezen kívül kisméretű telítetlen vegyületek, mint pl. acetilén, azid, vagy cianid redukcióját is elősegíti.

A nitrogénkötéshez szükséges redukálóképességre és energiára a sejtek anyagcsere-folyamataik révén tesznek szert. A felhasználásra kerülő reduktánsok eredete és természete nagyon eltérő lehet. Így pl. a *Clostridium*-típusú anaerobok az elektrondonor piruvátot cukrok fermentációjával állítják elő, míg a szigorúan aerob baktériumokban, pl. az *Azotobacter*ekben a szerves savakból, alkoholokból és cukrokból származó protonok és elektronok a citrát-ciklusban szerepet játszó dehidrogenázok működése révén termelődnek. A nitrogén redukciójához a reduktánsokat a fotoszintetizáló fajok fotokémiai úton termelik. Az ATP-t a fermentáló fajokban szubsztrát szintű foszforiláció (pl foszforoklaszt reakció), míg az aerobokban továbbá a fotoszintetizáló fajokban az oxidatív illetve a fotofoszforiláció biztosítja (Szabó, 1989).

1.1.3. A reduktánsok és az ATP előállítása a bakteroidokban

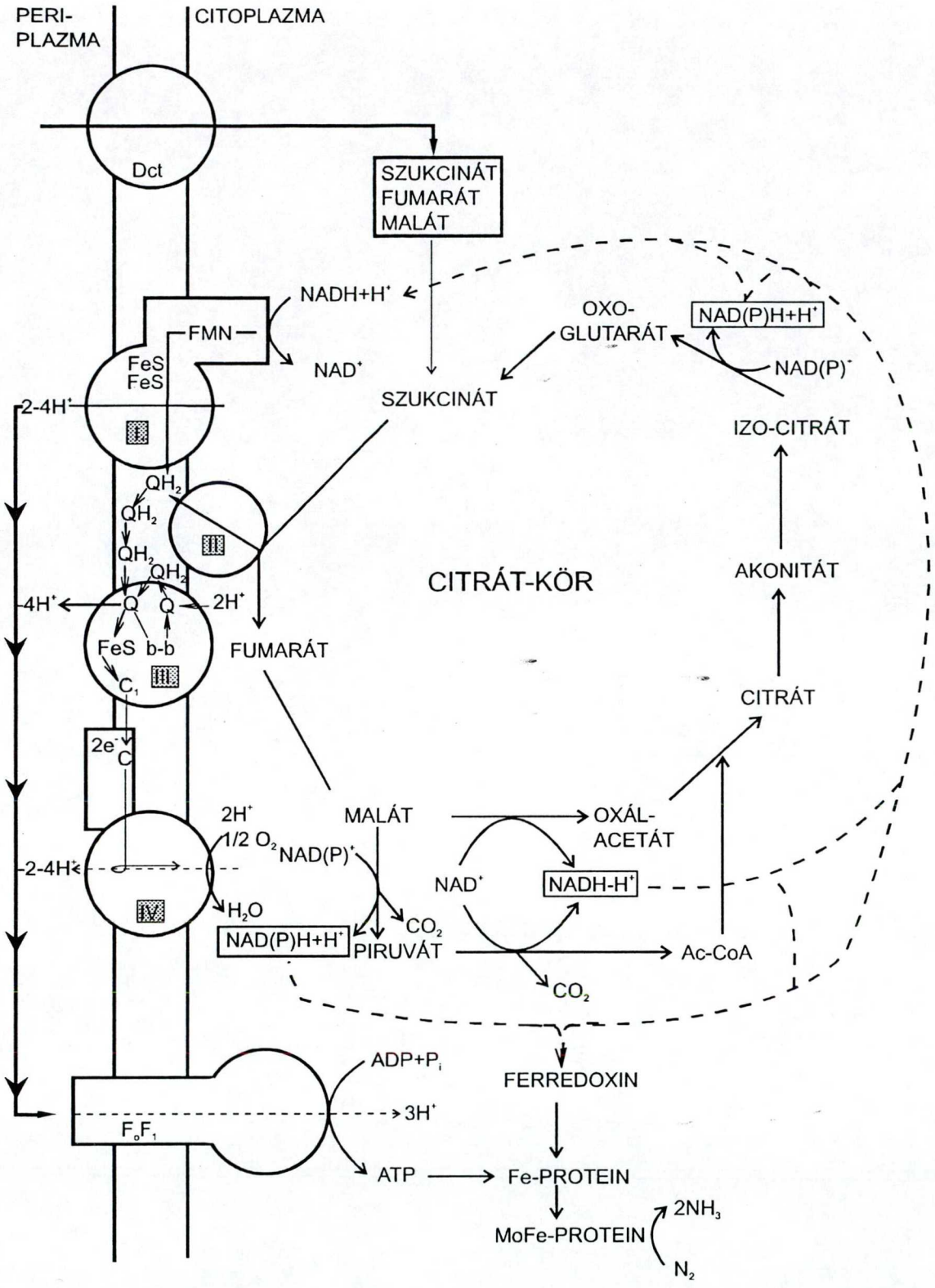
Az aerob diazotróf baktériumok oxigén-érzékeny nitrogenázuk védelme érdekében intracellulárisan anaerob (mikroaerob) körülményeket hoznak létre, ugyanakkor energiatermelésük teljes mértékben respirációra épül, melyben a végső proton- és elektronakceptor az oxigén. Ezek a mikroorganizmusok alapvetően két stratégiát fejlesztettek ki, hogy a nyilvánvaló kényszerhelyzettel megbirkózzanak: (i) egyes baktériumok, mint például az *Azotobacter vinelandii* gyors respirációval, azaz az oxigén elfogyasztásával oldják fel ezt a dilemmát (Kelly és mtsai, 1990); (ii) míg mások, köztük a

Klebsiella pneumoniae, az olyan alacsony parciális oxigén-nyomásnál, nagy oxigénaffinitású oxidázokkal végbemenő energianyerést részesítik előnyben, mely már nem káros a nitrogenáz számára (Hill és mtsai, 1990).

A *Rhizobium*ok a szimbiotikus nitrogénkötés során a második mechanizmust, azaz a mikroaerob körülmények között végzett respirációt alkalmazzák. A következő alfejezetekben rövid áttekintést nyújtok arról a mikrokörnyezetről, amelyben a légköri nitrogén redukciója folyik, milyen mechanizmusok biztosítják a bakteroidok tápanyagellátását valamint a nitrogénredukcióhoz szükséges energiát.

1.1.3.1. Tápanyagellátás és felhasználás a bakteroidokban

A *Rhizobium*ok sajátos környezeti feltételek között, növényi sejtek belsejében végzik a légköri nitrogén redukcióját. E környezetben teljesen a növényre vannak utalva, ugyanis egyrészt partnerük biztosítja a nitrogéngáz redukciójához szükséges mikroaerob környezetet (ld következő alfejezet), másrészt a növénynek kell ellátnia őket a megfelelő tápanyag- és energiaforrással, melyet a nitrogénkötés folyamatához használnak fel. A gyökérgümő sejtjei elegendő mennyiségben tartalmaznak többféle szénhidrátot és szerves savat, melyek mind potenciális szubsztrátjai a baktériumok respirációjának. Ahhoz, hogy egy lehetséges tápanyagot a bakteroidok valóban felhasználhassanak, két fő kritériumnak kell eleget tennie: egyrészt hatékonyan kell transzportálódnia a peribakteroid membránon keresztül, másrészt a bakteroidoknak megfelelő sebességgel kell felvenniük és metabolizálniuk, hogy a nitrogén-redukció igényeit kielégítsék. Bár kimutatták, hogy a fotoszintézis termékei a gümőbe szacharóz formájában jutnak el (Lawry és Wheeler, 1975), azonban izolált bakteroidok sem a szacharózt, sem a hidrolíziséből származó hexózokat nem tudták hatékonyan akkumulálni és metabolizálni (Day és Copeland, 1991).



3. ábra. A tápanyagok felhasználása és az energianyerés a bakteroidokban. Dct: dikarbonsav-transzporter, I.-IV.: a légzési lánc elemei, I.: NADH:ubikinon oxido-reduktáz, II.: szukcinát-dehidrogenáz, III.: citokróm bc_1 komplex, IV:. terminális oxidáz, C: *c*-típusú citokróm, F_0F_1: reverzibilisen működő F_0F_1 ATPáz

Biokémiai és genetikai vizsgálatok eredményei szerint a fenti kritériumoknak leginkább bizonyos dikarbonsavak (főleg almasav, valamint fumársav, borostyánkősav) felelnek meg. Mind a peribakteroid membránon, mind a bakteroidok sejtmembránján aktív transzporttal, úgynevezett dikarboxilát-transzportereken keresztül jutnak át (3.ábra). A bakteroidok tehát energiát és tápanyagot nem ATP és cukrok, hanem citrát-ciklus intermedier dikarbonsavak formájában kapnak gazdanövényüktől (Jording és mtsai, 1994). A (másik két dikarbonsavból is képződő) almasav további átalakításában két enzim vesz részt a bakteroidokban (3.ábra): a citrát-ciklusban az almasav oxál-ecetsavvá oxidálódik a malát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban, míg a malát-dekarboxiláz enzim oxidatív dekarboxilezéssel piroszőlősavvá alakítja, melyből aztán a piruvát-dehidrogenáz acetil-koenzim-A-t állít elő. Ily módon a citrát-ciklus működéséhez mind oxál-ecetsav, mind acetil-koenzim-A képződik a bakteroidokba transzportált dikarbonsavakból (Day és Copeland, 1991). Az oxál-ecetsav és az acetil-koenzim-A kondenzációjával induló egyetlen ciklus során a dehidrogenázok működése révén 4 pár hidrogén és elektron szakad le a szubsztrátokról, mely egyrészt a molekuláris nitrogén redukciójára fordítódik, másrészt a terminális oxidáció számára képez üzemanyagforrást (3. ábra).

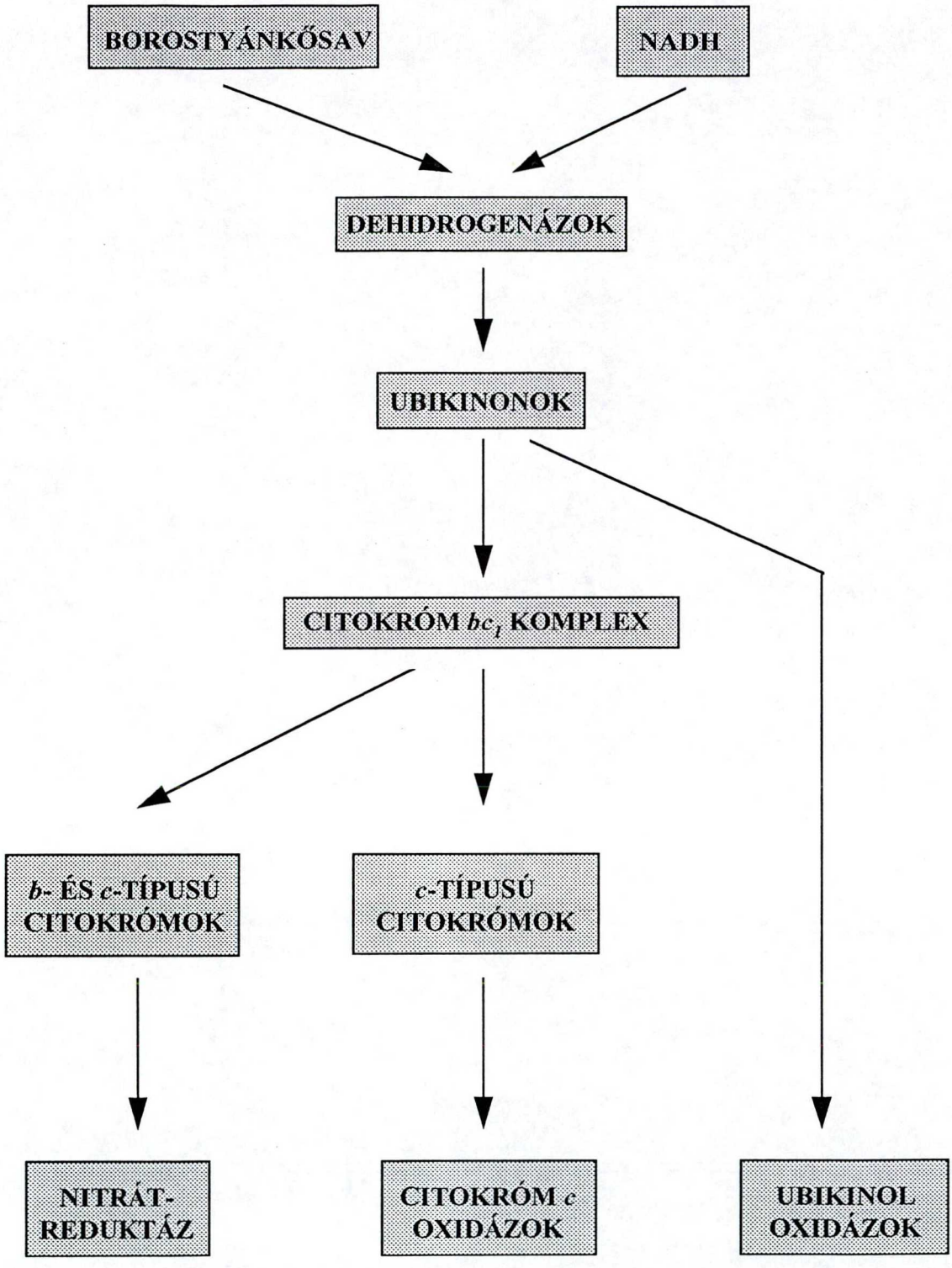
1.1.3.2. A szimbiotikus gyökérgümő mikrokörnyezete

A szabadon élő *Rhizobium*ok bakteroiddá történő átalakulását drámai fiziológiai változások kísérik, ugyanis a baktériumoknak egy aerob életstílusról mikroaerobra kell átállniuk. Még nem ismeretes, hogy ez a váltás pontosan mikor következik be. Megtörténhet a gümő fejlődésének olyan korai szakaszában, amikor a baktériumok elszaporodnak az infekciós fonalban, vagy később, mikor bekerülnek a növényi sejtek citoplazmájába. Az is előfordulhat, hogy a baktériumok egy folyamatos oxigén-megvonáson mennek keresztül, ahogy a gümő kialakulása előrehalad (Hennecke, 1994). Az azonban bizonyos, hogy a gümő belsejében, a nitrogén redukcióját végző bakteroidokat

tartalmazó szövetekben az oxigénkoncentráció 5-30 nM, amely 4-5 nagyságrenddel kisebb, mint a standard aerob környezet körülbelül 250 μM-os oxigénkoncentrációja (Layzell és mtsai, 1990). Ez a mikroaerob környezet szükséges az oxigén-szenzitív nitrogenáz enzimrendszer optimális működéséhez, s ugyanakkor nagy kihívás az obligát aerob *Rhizobium*ok számára, hogy respiráció, azaz oxidatív foszforiláció révén elegendő energiát termeljenek a rendkívül energiaigényes nitrogénkötés számára. A gümősejtek ilyen alacsony oxigénszintjét két mechanizmus biztosítja: Egyrészt szorosan összetapadt sejtek rétegei egy oxigéndiffúziós gátat hoznak létre a gümőkortexben. Hasonló funkcióval rendelkezik a gümő belsejében a fejlődési vagy prefixációs, valamint a nitrogénkötési zónát elválasztó interzóna amiloplasztokat tartalmazó első sejtsora is, ahol mikroelektródos mérések szerint az oxigénkoncentráció hirtelen leesik (Witty és Minchin, 1990). Másrészt a gümő belsejében az oxigén áramlását egy nagy koncentrációban jelenlevő gümőspecifikus fehérje, a leghemoglobin szabályozza. A leghemoglobin és az oxigén kötődése nagy sebességgel, míg disszociációjuk lassan megy végbe, így a sejtekben az oxigenált leghemoglobin mennyisége állandóan magas, viszont a szabad oxigén koncentrációja a fentebb említett nagyon alacsony szinten marad (Appleby, 1984).

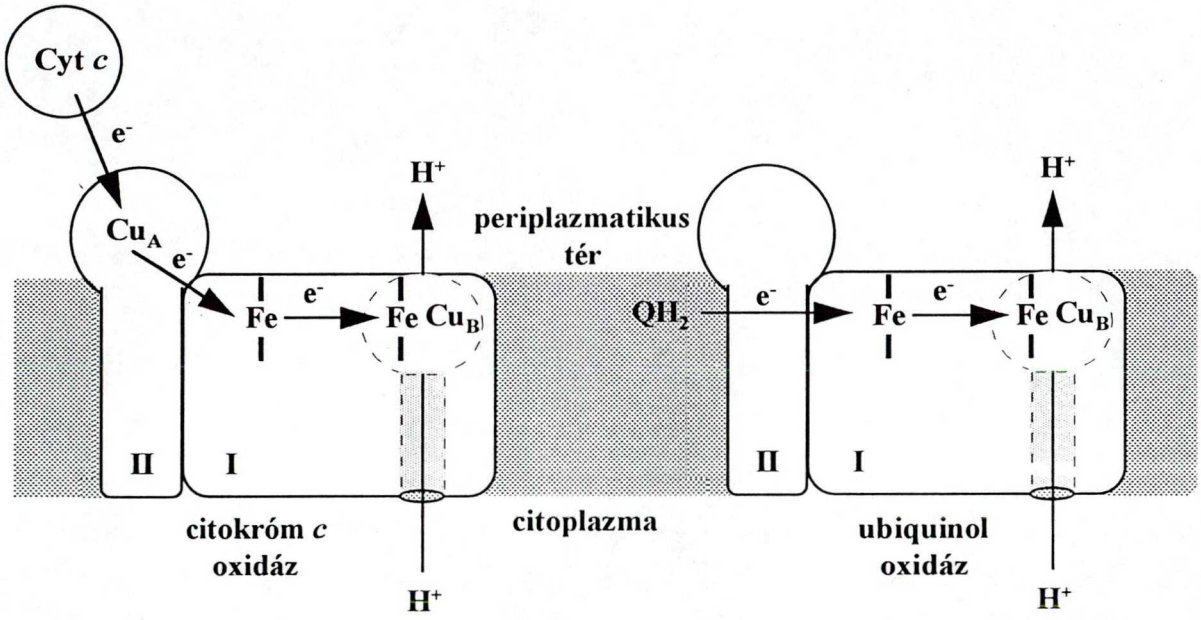
1.1.3.3. A bakteriális elektrontranszport-láncok felépítése, működése és funkciója

Az ily nagy mértékben eltérő O_2-koncentrációknál az aerob baktériumok, így a *Rhizobium*ok is, olyan légzési láncokon keresztül nyernek energiát, amelyek más és más oxigénaffinitású terminális oxidázokkal végződnek. Tehát a mitokondriumokkal szemben, amelyek csak egyetlen típusú légzési lánccal rendelkeznek, az aerob baktériumokban elágazó légzési láncok a jellemzőek (4. ábra).



4. ábra. A baktériumok respirációs rendszerének általános sémája

A különböző dehidrogenázok működése eredményeként a tápanyagokból származó protonok és elektronok a redukált kofaktorokról (NAD(P)H, $FADH_2$, $FMNH_2$) a citoplazma-membrán kinonjaira kerülnek (3. és 4. ábra). Innen az elektronok egy vagy több lépésben a membránba ágyazódó terminális oxidázokra jutnak, melyeknek két alapvető osztályuk van: a ubikinol-oxidázok és a citokróm *c* oxidázok. Az elektronokat a ubikinol-oxidázok közvetlenül a ubikinoloktól, míg a citokróm *c* oxidázok a citokróm bc_1 komplex (vagy más néven ubikinol:citokróm *c* oxidoreduktáz) által redukált citokróm *c* fehérjéktől kapják (Anraku, 1988).



5. ábra. A két alapvető terminális oxidáz család, a citokróm *c* és a ubikinol oxidázok közötti hasonlóságok és különbségek sematikus ábrázolása. Az egyszerűség kedvéért csak az I. és a II. alegységeket tüntettük fel.

Az utóbbi években tekintélyes mennyiségű adat gyűlt össze a különböző oxidázok elsődleges szerkezetéről, alegység-összetételéről, a kapcsolódó kofaktorokról (García-Horsman és mtsai, 1994): A citokróm *c* oxidázok legalább három alegységből épülnek fel (5. ábra). Közülük a II. alegység létesít kapcsolatot a *c*-típusú citokrómokkal, melyektől az

elektronokat a két rézatomot tartalmazó, úgynevezett Cu_A center veszi át. Az I. alegységben található egy másik réztartalmú redox-központ (Cu_B), valamint két hem, melyek közül az egyik a Cu_B-vel egy úgynevezett kétmagvú központot (binuclear center) alkot. Az elektronok a II. alegységről a második hemen keresztül jutnak a kétmagvú központra, mely az oxigén vizzé történő redukciójának színhelye. A szintén több alegységből felépülő ubikinol oxidázok meglepően nagy hasonlóságot mutatnak a citokróm *c* oxidázokhoz mind alegység-összetételükben, mind elsődleges szerkezetükben (5. ábra).

A két oxidáz családban például az I. alegységek aminosav-sorrendje körülbelül 40%-ban azonos. A fő különbség, hogy az ubikinol oxidázok II. alegysége nem tartalmaz Cu_A redox központot, és hiányoznak a *c*-típusú citokrómokkal kölcsönhatást biztosító aminosavak is. A különböző oxidázok I. alegységeihez a hem prosztetikus csoportok igen széles választéka (*a*, *b*, *d*, *o* típusok) szinte tetszőleges kombinációban (aa_3, bb_3, *bo*, *bd*, *ao*) kapcsolódhat.

Anaerob körülmények között bizonyos baktériumok, köztük a *Rhizobiaceae* család egyes tagjai, pl. *Bradyrhizobium japonicum*, (míg a *Rhizobium meliloti* erre nem képes) a szerves vegyületek elégetéséhez terminális elektronakceptorként nitrátot használnak fel (4. ábra). *Bradyrhizobium japonicum*ban az oxigénhez vezető elektrontranszport-láncból a nitrát felé a citokróm bc_1 komplex szintjén jön létre a leágazás, ugyanis a komplexet kódoló génben mutációt hordozó sejtek nitrát-légzésre képtelenek (Thöny-Meyer és mtsai, személyes közlés). Az elektronok továbbszállításában *b*- és *c*-típusú citokrómok vesznek részt (Bott és mtsai, 1995). Az elektrontranszport-lánc "terminális oxidáza" a nitrát→nitrit átalakulást katalizáló, molibdént és nem-hem vasat tartalmazó nitrát-reduktáz.

A citoplazma-membránba ágyazódó légzési láncok fő funkciója, hogy az elektronok mozgásához szorosan kapcsolódva protonokat pumpálnak ki a periplazmatikus térbe, létrehozva ezzel egy proton elektrokémiai potenciálkülönbséget, melyet protonmozgató

erőnek neveznek (3. ábra). A protonmozgató erő a forrása például az ATP szintézisének, számos tápanyag aktív transzportjának, a proteinek szekréciójának és a sejtek mozgásának. A periplazmába került protonok visszajuttatását és az ATP szintézisét egy reverzibilisen is működő komplex, az F_0F_1-ATPáz katalizálja. A jelenlegi eredmények szerint minden három protonra számítva, amely a komplexen visszaáramlik, egy molekula ATP szintetizálódik ADP-ből és anorganikus foszfátból (Mitchell, 1991)

A légzési láncok összetételét a szimbiotikus nitrogénkötők közül több fajban is tanulmányozták (de Hollander és Stouthamer, 1980; Soberon és mtsai, 1989; Kitts és Ludwig, 1994), azonban mindezidáig a legteljesebb kép a *Bradyrhizobium japonicum* respirációs rendszeréről áll rendelkezésünkre. Ezek a vizsgálatok korábban főleg spektroszkópiai módszerekkel történtek, míg a genetikai megközelítéseket csak az utóbbi években kezdték alkalmazni. E faj bizonyos citokróm *c*-deficiens mutánsai pleitróp fenotípussal rendelkeznek: sem szabadon élve, sem szimbiózisban nem kötnek nitrogént; anaerob körülmények között nem képesek a nitrátot terminális elektron-akceptorként használni; és nincs citokróm *c* oxidáz aktivitásuk (Ramseier és mtsai, 1991; Ritz és mtsai, 1993; 1995). Hasonlóképp, a *Rhizobium leguminosarum* számos citokróm *c*-hiányos mutánsa sem redukálja a légköri nitrogént (Soberon és mtsai, 1993; Vargas és mtsai, 1994).

1.1.3.4. A szimbiotikus körülmények között funkcionáló terminális oxidációs lánc

Régóta fennálló hipotézis, hogy a *Rhizobium*ok endoszimbiotikus formái a mikroaerob körülmények között történő energianyeréshez egy nagy oxigén-affinitású terminális oxidáz indukciójával alkalmazkodnak (Appleby, 1984). Korábban egy ilyen oxidáz oxigénre vonatkoztatott Michaelis-Menten állandóját ($K_M[O_2]$) 5-10 nM-nak jósolták. Egy nemrégiben publikált vizsgálat szerint a szója gyökérgümőkből izolált intakt *Bradyrhizobium* bakteroidokban a terminális oxidáz $K_M[O_2]$ értéke 20-27 nM, ami a

gümőkben mért szabad oxigén koncentrációjával megegyező értéktartományba esik (Bergersen és Turner, 1993).

Appleby és Bergersen már 1958-ban kimutatta, hogy aerob tenyészetben növesztett *Bradyrhizobium japonicum* sejtek hemoprotein összetétele különbözik a szója gyökérgümőkből izolált bakteroidokétól. Az aa_3- és *o*-típusú citokrómok, melyek aerob körülmények között betöltött oxidáz funkcióját fotokémiai vizsgálatokkal igazolták, a bakteroidokban nem voltak jelen. Az utóbbi években genetikai kísérletekkel is bizonyították, hogy *Bradyrhizobium*okban sem a mitokondriumokéhoz hasonló, a citokróm aa_3 terminális oxidázzal végződő, sem egy másik, aerob körülmények között működő, *c*-típusú citokrómo(ka)t tartalmazó elektrontranszport lánc nem szükséges a szimbiotikus nitrogénkötéshez. Akár a citokróm aa_3-típusú oxidáz I. alegységét kódoló *coxA* génben, akár a különböző, aerob körülmények között kimutatható *c*-típusú citokrómok struktúrgénjeiben hoztak létre mutációt, a mutáns baktériumok effektív szimbiózist hoztak létre (Bott és mtsai, 1990; 1991; 1995; Rossbach és mtsai, 1991; Tully és mtsai, 1991). Hasonlóképp, ha egy a *coxMNOP* operon által kódolt alternatív terminális oxidáz (a feltételezések szerint a citokróm *o*) valamely alegysége hiányzik, akkor a baktériumok képesek a légköri nitrogén redukciójára (Bott és mtsai, 1992). Ezzel szemben, a Rieske vas-kén fehérjét és a citokróm bc_1 komplex struktúrfehérjéit kódoló *fbcFH* operonban bekövetkező mutáció esetén a baktériumok bakteroiddá történő átalakulása zavart szenved és nem fixálnak nitrogént (Thöny-Meyer és mtsai, 1989). Ez az eredmény arra utalt, hogy a bakteroidokban az elektronok a citokróm bc_1 komplexről *c*-típusú citokróm(ok)on keresztül egy új, szimbiózis-specifikus citokróm *c* oxidázra kerülnek. Valóban, azok a *Bradyrhizobium japonicum* mutánsok is, melyekben az összes *c*-típusú bioszintézise sérült, nem képesek a légköri nitrogén redukciójára (Ramseier és mtsai, 1991). Az elmúlt években Preisig és mtsai (1993) azonosítottak egy a szimbiotikus nitrogénkötés szempontjából nélkülözhetetlen géncsoportot (*fixNOQP*), amely a nitrogénkötési génekhez hasonlóan csak rendkívül alacsony O_2-koncentrációnál iródik át. A *fixNOQP* génekben

mutációt hordozó baktériumok aerob környezetben a vad típushoz hasonló fenotípust mutatnak, míg mikroaerob körülmények között citokróm *c* oxidáz aktivitásuk erősen lecsökkent, és membránfehérjéik közül legalább egy, de valószínűleg két *c*-típusú citokróm hiányzott. A szekvenciaanalízis kiderítette, hogy az operon egy új, citokróm *c*-t tartalmazó, citokróm cbb_3-típusú terminális oxidázt kódol, melyből hiányzik a hagyományos oxidázok II. alegysége. A biokémiai vizsgálatok szerint az elektronok belépési helye a FixP, amely két hem-csoportot tartalmazó *c*-típusú citokróm , ahonnan a másik citokróm *c*-n, a FixO-n keresztül jutnak el a FixN proteinre, majd molekuláris oxigénre. A FixN az egyéb terminális oxidázok első alegységének felel meg, két *b*-típusú hemet valamint Cu_B redox központot tartalmaz. A részlegesen megtisztított enzimkomplex elfogadta elektrondonorként a lószívből izolált citokróm *c* redukált formáját, és képes volt az oxigént az oxigenált szója leghemoglobinból proton- és elektron-akceptorként felhasználni. A mérések szerint a tisztított oxidáz oxigénre vonatkoztatott Michaelis-Menten állandója ($K_M[O_2]$) 7 nM (Preisig és mtsai, 1996). A rendelkezésre álló genetikai és biokémiai adatok alapján csaknem bizonyosan állíthatjuk, hogy a *fixNOQP* operon kódolja a bakteroidokban működő nagy oxigénaffinitású terminális oxidázt.

1.2. Kutatási előzmények

*Rhizobium meliloti*ban, a lucerna (*Medicago sativa*) szimbiotikus partnerében eddig még sem a különböző elektrontranszport-láncok komponenseit, sem a szimbiotikus nitrogénkötés során szerepet játszó citokrómokat nem tanulmányozták. A *Bradyrhizobium japonicum*mal ellentétben, a *Rhizobium meliloti* egyrészt szabadon élve nem tudja a légköri nitrogént redukálni, másrészt nem képes a nitrátot mint terminális elektron-akceptort hasznosítani oxigén hiányában. Érdekesség viszont, hogy logaritmikus növekedési fázisa végén egy magas nitrát-reduktáz aktivitás jelenik meg, melyet "respirációs" nitrát-reduktáz aktivitásként emlegetnek (Kondorosi és mtsai, 1973; Sík és

Barabás, 1977; Kiss és mtsai, 1979). Régebbi vizsgálatok során kiderült, hogy a *R. meliloti* "respirációs" nitrát-reduktáz hiányos (Rnr^-) mutánsai a gazdanövény gyökerén ugyan létrehoznak gyökérgümőket, és be is jutnak a növényi sejtek citoplazmájába, azonban nem fixálnak nitrogént (Kondorosi és mtsai, 1973). A szerzők szerint a mutációk pleitróp fenotípusára magyarázat lehet, hogy (i) vagy a molibdén transzportja illetve beépülése a nitrát-reduktáz és a nitrogenáz kofaktorába nem történik meg egy fehérje hibája miatt, (ii) vagy pedig az elektronokat a két redukáló enzimhez szállító elektrontranszport-láncok valamely közös eleme sérült. Későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy bár a mutánsok a vad típusú baktériumokénál 30-100-szor kisebb metil viologén-kapcsolt nitrát-reduktáz aktivitással bírnak, viszont ez az aktivitás elegendő ahhoz, hogy a sejtek a nitrátot, mint egyedüli nitrogénforrást hasznosítsák. Mi több, a mutánsokból a nitrát-reduktáz aktív kofaktorát is tudták izolálni, valószínűsítve, hogy a mutációt szenvedett gén nem a molibdén-tartalmú kofaktorok bioszintéziséhez szükséges fehérjét (Sík és Barabás, 1977; Kiss és mtsai, 1979), hanem az enzimekhez vezető elektrontranszport-láncok valamely közös elemét, vagy a közös elem(ek) szintézisében szerepet játszó fehérjét kódol.

Annak megismerése érdekében, hogy a két reduktív folyamatot, azaz a nitrát-redukciót és a szimbiotikus nitrogénkötést egyaránt befolyásoló mutáció milyen géneket érintett, izolálni kellett a megfelelő vad típusú DNS-régiót. Az Rnr^-Fix^- fenotípusú N461 mutánsba (Kondorosi és mtsai, 1973) bejuttatták konjugációval a pVK102 kozmid vektorban (Knauf és Nester, 1982) készült *R. meliloti* génbankot (Putnoky és mtsai, 1988), és vizsgálták a transzkonjugánsok fenotípusát. Az 1500 tesztelt transzkonjugáns közül három bizonyult Rnr^+Fix^+ fenotípusúnak. Mind a három ugyanazt a pKSK1-nek elnevezett kozmid klónt hordozta. Hibridizációs kísérletekkel megállapították, hogy a komplementáló géntár-klón által hordozott DNS-darab a *R. meliloti* kromoszómájából, s nem valamelyik plazmidjából származik (Slaska-Kiss Krystyna, személyes közlés). A mutáns lókusz helyzetét a kromoszómán Forrai és mtsai (1983) módszerével határozták meg. A mutáció több mint 90%-os kapcsoltságot mutatott az *ade-1*, *cys-46* markerpárral, jelezve, hogy a lókusz vagy

közöttük, vagy nagyon közel valamelyikükhöz található. Korábbi vizsgálatokban (Forrai és mtsai, 1983) a random Tn5 mutagenezissel előállított ZB313 törzs *fix-14* jelű mutációja is ide térképeződött. Annak eldöntésére, hogy a ZB313 és N461 törzsekben mutációt szenvedett lókuszok azonosak-e, konjugációval bejuttatták a *fix-14* mutációt komplementáló pPP381 kozmidot, illetve a pKSK1 klónt a mutánsokba, majd mind a mutánsok, mind a transzkonjugánsok nitrát-reduktáz aktivitását és nitrogénkötő képességét megvizsgálták. E vizsgálatokból kiderült, hogy a két törzsben ugyanazon gén, vagy azonos folyamatban szerepet játszó, és ugyanabban a DNS-régióban elhelyezkedő gének szenvedtek mutációt, ezért ezek után erre a régióra, mint *fix-14* régióra hivatkozunk. A *fix-14* régióban található gének behatárolására korábban irányított Tn5 mutagenezist hajtottak végre a pPP381 kozmidon, majd a mutációkat homológ rekombinációval bejuttatták a vad típusú *R. meliloti* genomjába. A kromoszóma körülbelül 4.5 kb-nyi szakaszán (6. ábra) eredményeztek a Tn5 inszerciók Fix$^-$ fenotípust (Putnoky Péter, személyes közlés).

A dolgozatomban ismertetett munka során arra kerestünk választ, hogy mi az a sejtalkotó, melynek hiánya a mutánsok pleiotróp fenotípusát okozza, s ennek a struktúrának a létrehozásában milyen szerepet játszhatnak a *fix-14* régióban található gének.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat anyagát képező munka megkezdésekor feltételeztük, hogy *Rhizobium meliloti* kromoszóma körülbelül 4.5 kb-os szakaszán, a *fix-14* régióban a gének olyan fehérjéket határoznak meg, amelyek vagy a "respirációs" nitrát-reduktázhoz és a nitrogenázhoz vezető elektrontranszport láncok közös elemei, vagy e közös elemek bioszintézisében vesznek részt.

Célul tűztük ki hipotézisünk helyességének megállapítását, azaz a *fix-14* régióban található gének funkciójának felderítését. Célunkat genetikai és biokémiai vizsgálatok segítségével akartuk elérni. Ehhez a következő részfeladatok megoldása útján kívántunk eljutni:

-Különbségek detektálása spektroszkópiai és biokémiai módszerekkel a vad típusú és a mutáns baktériumok elektrontranszport-láncainak az összetételében.

-A *fix-14* régió nukleotid sorrendjének meghatározása.

-A szekvencia számítógépes elemzése útján a lehetséges kódoló szakaszok, "nyitott leolvasási keret"-ek (open reading frame-ek, ORF-ek) azonosítása.

-Az azonosított ORF-ek által meghatározott fehérjetermékek aminosav-sorrendjének összevetése adatbankokban tárolt szekvenciákkal. Ismert funkciójú fehérjékkel való hasonlóság esetén következtethetünk a régióban kódolt fehérjék biokémiai szerepére.

-A prediktált funkció ellenőrzése biokémiai módszerek segítségével.

SZEGED

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok

A disszertációban szereplő baktérium törzseket, bakteriofágokat és plazmidokat az 1. táblázatban tüntettük fel. A plazmidon levő, illetve a *Rhizobium meliloti* genomba homológ rekombinációval bejuttatott Tn5 transzpozon inszerciók elhelyezkedése a 6. ábrán látható.

1. táblázat. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok.

elnevezés	jellemzők	hivatkozás/forrás
Escherichia coli		
JM109	*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1* (*lac-proAB*) (F *traD36proAB lacI^{q}Z M15*)	Yanisch-Perron és mtsai, 1985
HB101	*hsdS hsdM pro leu thi gal lacY recA str*	Boyer és Roulland-Dussoix, 1969
CHO52	HB101(pCHO8::Tn5[52])	Putnoky P. és C.H.Ung
CHO56	HB101(pCHO8::Tn5[56])	Putnoky P. és C.H.Ung
CHO66	HB101(pCHO8::Tn5[66])	Putnoky P. és C.H.Ung
CHO87	HB101(pCHO8::Tn5[87])	Putnoky P. és C.H.Ung
Rhizobium meliloti		
Rm41	vad típus, Nod$^+$Fix$^+$	Szende és Ördögh, 1960
AK631	Rm41 *exoB*, Nod$^+$Fix$^+$	Kondorosi Ádám
N461	Rm41 Rnr$^-$Fix$^-$	Kondorosi és mtsai, 1973
ZB313	AK631 *fix-14*	Forrai és mtsai, 1983
CHO52h	AK631 *fix-14* ::Tn5[52]	Putnoky P. és C.H.Ung
CHO56h	AK631 *fix-14* ::Tn5[56]	Putnoky P. és C.H.Ung
CHO66h	AK631 *fix-14* ::Tn5[66]	Putnoky P. és C.H.Ung

CHO87h	AK631 *fix-14* ::Tn5[87]	Putnoky P. és C.H.Ung
AT314	AK631 *fix-14* ::Km^R	jelen munka
AT316	AK631 *fix-14* ::Km^R	jelen munka
Bakteriofágok		
M13mp18/19	egyszálú fág vektor	Norrander és mtsai, 1983
Plazmidok		
pUC19	Ap^R	Yanisch-Perron és mtsai, 1985
pLAFR1	Tc^R, széles gazdaspektrumú kozmid vektor	Friedman és mtsai, 1982
pVK102	Tc^RKm^R széles gazdaspektrumú kozmid vektor	Knauf és Nester, 1982
pPP381	pLAFR1::*fix-14* régió	Putnoky P. és C.H.Ung
pCHO8	pLAFR1::*fix-14* régió	Putnoky P. és C.H.Ung
pKSK1	pVK102::*fix-14* régió	Slaska-Kiss K.

3.2. Mikrobiológiai eljárások

Az *E. coli* törzseket LB tápközegben (Sampbrook és mtsai, 1989) 37 °C-on, a *R. meliloti* törzseket YTA (Orosz és mtsai, 1973) vagy 1 mM NH_4Cl-dal kiegészített GTS (Kiss és mtsai, 1979) táptalajokon 30 °C-on növesztettük. A rezisztencia-markert hordozó törzsek táptalaja a 2. táblázatban feltüntetett koncentrációban tartalmazta a megfelelő antibiotikumot.

2. táblázat. Az alkalmazott antibiotikumok végkoncentrációja (μg/ml)

Antibiotikum	*E. coli*	*R. meliloti*
tetraciklin	15	15
ampicillin	100	-
kanamicin	30	200
streptomicin	100	100

Az M13 fág származékokat JM109 baktériumon szaporítottuk el: egy éjszakán át növesztett baktériumkultúrát százszorosára higítottunk, és ebből 2 ml-t inokuláltunk fogpiszkálóval leszedett egyetlen tarfolttal. A tenyészetet 37 °C-on intenzív levegőztetés mellett 6-8 óra hosszat inkubáltuk.

A kompetens *E. coli* sejtek előállítására Inoue és mtsai (1990) módszerét alkalmaztuk. A logaritmikus fázisig (OD_{600}=0.5-0.6) felnövesztett 200 ml baktériumtenyészetet 0 °C-ra lehűtöttük, centrifugáltuk, majd a sejteket 80 ml 0 °C-os TB pufferben (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, pH=6.7) szuszpendáltuk. A szuszpenziót 10 percig 0 °C-on inkubáltuk, majd újboli centrifugálást követően a sejteket 20 ml, 7% dimetil-szulfoxidot tartalmazó TB pufferben szuszpendáltuk. Az így előállított kompetens sejteket vagy azonnal transzformáltuk, vagy felhasználásukig -80 °C-on tároltuk. A sejtekbe a DNS-t hősokk (37 °C, 2 perc) alkalmazásával juttattuk be.

3.3. Rekombináns DNS-technikák

A plazmid DNS-t az Ish-Horowitz és Burke (1981) által kidolgozott alkalikus lízis módszerével tisztítottuk. A baktériumokat 0.2 M NaOH, 1% SDS tartalmú eleggyel tártuk fel, majd a lizált sejtanyagot és a kromoszómális DNS-t 0 °C-os Na-acetáttal (3 M, pH 4.8) csaptuk ki. A csapadék eltávolítása után a felülúszóból izo-propanollal precipitáltuk a plazmid DNS-t, majd visszaoldás után etanollal újra kicsaptuk. A 1.5 ml baktériumtenyészetből izolált (miniprep) DNS 1/3-1/100 részét részét használtuk restrikciós endonukleázokkal történő emésztésekre.

Nagy mennyiségű plazmid DNS izolálása esetén 1 liter baktérium kultúrából indultunk ki, és az oldatok térfogatának arányos növelésével az előbbiekben leírt módszert alkalmaztuk. Az így nyert DNS-mintát CsCl grádiensen történő ultracentrifugálással tisztítottuk tovább (Sampbrook és mtsai, 1989).

A restrikciós enzimekkel történő emésztést és a DNS gélelektroforézisét a Sampbrook és mtsai (1989) által leírtak alapján végeztük el.

Az emésztett DNS fragmentjeit agaróz gélen (0.8-1.5%) választottuk el TBE puffer (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA, pH=8.3) jelenlétében. A DNS-t 0.5 μg/ml

koncentrációjú etídium-bromid oldattal festettük, és ultraibolya (UV) fénnyel tettük láthatóvá.

Restrikciós fragmenteket általában alacsony olvadáspontú agaróz (Sigma, Type VII) gélből izoláltunk. 1-5 μg emésztett DNS gélelektroforézise után a kívánt fragmentet tartalmazó géldarabot nagy hullámhosszú UV-fényben szikével kivágtuk, azonos térfogatú TE puffert (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8) adtunk hozzá, majd 20 percig 65 °C-on inkubálva felolvasztottuk. A DNS-fragmentet fenollal és kloroformmal történő tisztítás után etanollal kicsaptuk.

Az izolált fragmenteket megfelelően emésztett M13mp18, mp19, és pUC19 vektorokba ligáltuk (2-12 óra, 16-25 °C), majd JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk. Az inszertet tartalmazó klónokat 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidot (X-Gal) és izopropil-β-D-galaktopiranozidot (IPTG) tartalmazó táptalajon válogattuk ki, és a rekombináns DNS emésztésével ellenőriztük.

A szekvenálási reakciókhoz az egyszálú templát DNS-t vagy az M13 fág származékokból izoláltuk, vagy plazmid DNS denaturációjával állítottuk elő:

Az M13 fággal fertőzött *E.coli* JM109 baktériumokat 6-8 órán keresztül, intenzív levegőztetés mellett 37 °C-on növesztettük, centrifugáltuk, és 1.3 ml felülúszóhoz 200 μl 20% PEG-et és 2.5 M NaCl-ot tartalmazó oldatot adtunk. Összekeverés után az elegyet 20 percig szobahőn inkubáltuk, az aggregálódott fágrészecskéket 10 perces centrifugálással összegyűjtöttük, majd 100 μl TE pufferben szuszpendáltuk. A fágfehérjéket fenol-kloroform extrakcióval eltávolítottuk, végül a DNS-t etanollal kicsaptuk.

A szekvenálni kívánt plazmid klónokat a United States Biochemicals Sequenase szekvenálási protokoljában leírtak szerint denaturáltuk. 3-5 μg plazmid DNS-t azonos térfogatú 0.4 M NaOH-ot és 0.4 mM EDTA-t tartalmazó oldattal összekevertünk és az elegyet 37 °C-on inkubáltuk 30 percig. A denaturálódott DNS-t 1/10 térfogat 7.5 M NH_4-acetát és 2.5 térfogat etanol adásával kicsaptuk.

3.4. A DNS bázissorendjének meghatározása

Az előző alfejezetben leírt módszerekkel előállított templát DNS-ek szekvenciáját a Sanger és mtsai (1977) kidolgozott dideoxi láncterminációs technikán alapuló módszerrel állapítottuk meg. A United States Biochemicals (Cleveland, USA) Sequenase kit-jét és [^{35}S]-dATP-t használtuk a szekvenálási reakciókhoz, melyek során végig a gyártó előírásait, javaslatait követtük. A reakciók során M13-specifikus (-40 és reverz) primereket illetve a Tn5 transzpozon inszerciókat határoló DNS-szakaszok nukleotidsorrendjének meghatározása során egy Tn5-specifikus primert (5'-GCAAAACGGGAAAGGTTCCG-3') alkalmaztunk. A termékeket 25% formamidot tartalmazó, 5.5-7.5%-os poliakrilamid gélen választottuk el TBE puffer jelenlétében.

A DNS szekvencia adatok analízisét a PC/Gene (tervezte Amos Bairoch, IntelliGenetics) és a University of Wisconsin GCG (Devereux és mtsai, 1984) programcsomagok segítségével végeztük el. A különböző adatbankokban található hasonló szekvenciájú fehérjék és DNS-ek keresésére az elektronikus levelezésen (e-mail) keresztül elérhető, Altschul és mtsai (1990) által kifejlesztett BLAST programokat (National Center for Biotechnology, National Library of Medicine, Bethesda, Md, USA) használtuk fel. A rokon szekvenciák illesztését a FASTA (Pearson és Lipman, 1989) és a Multalin (Corpet, 1988) programok segítségével hajtottuk végre.

3.5. Növényi teszt

A növényi teszthez használt *Medicago sativa* ssp. *sativa* L. var Nagyszénási magvakat 95%-os etanolban (2 perc) és 0.2%-os $HgCl_2$ oldatban (10 perc) sterileztük. Többszöri steril desztillált vizes öblítés után a magokat 1%-os vizes agar talajon egy éjszakán át sötétben csíráztattuk. A csíranövényeket nitrogénmentes Gibson tápoldatot (Gibson, 1980) és 1% agart tartalmazó csövekbe helyeztük, és üvegházban neveltük (16 óra fényperiódus, 22 °C) a kísérlet kiértékeléséig.

A növények fertőzésére használt baktériumokat 0.9%-os NaCl oldatban szuszpendáltuk (10^8-10^9 sejt/ml), és 0.2 ml szuszpenzióval fertőztük a 3 napos csíranövényeket.

3.6. "Respirációs" nitrát-reduktáz aktivitás kimutatása

A szilárd táptalajon felnövesztett baktériumokra 10 mM $NaNO_3$ oldatban megnedvesített szűrőpapír korongokat helyeztünk, és 15 perc inkubálás után a filterekre frissen készített Griess-Ilosvay reagenst (1% szulfanilsav és 0.3% naftil-amin 30%-os ecetsavban) csepegtettünk (Kondorosi és mtsai, 1973). Az aktív nitrát-reduktáz által termelt nitrit-ionok a gyengén savas közegben a szulfanilsavat diazotálják, és a keletkezett vegyület a naftil-aminnal élénk rózsaszínű azofestékké kapcsolódik össze.

3.7. Citokróm *c* oxidáz teszt

A *R. meliloti* sejtek citokróm *c* oxidáz aktivitását egy, az enzim által felhasználható mesterséges elektrondonor, N,N,N',N',-tetrametil-para-feniléndiamin (TMPD) segítségével mutattuk ki. A GTS táptalajon felnövesztett baktériumtelepekre 9mM TMPD és 4 mM aszkorbinsav keverékét öntöttük (Soberon és mtsai, 1993). Ha a citokróm *c* oxidáz működik, azaz elektront vesz fel az elektrondonortól, és továbbítja az elektronakceptornak (aszkorbinsav), az egyébként színtelen TMPD oxidációja során egy kinoidális szerkezetű, kék színű molekula keletkezik, amely megfesti a telepeket.

3.8. *In vivo* differencia-spektroszkópia

A *Rhizobium* sejtek *in vivo* differencia-spektrumát az Appleby (1969) által leírt módszerrel vettük fel. 1 liter késői logaritmikus fázisú (OD_{600}=0.8-1.0) baktériumkultúrát centrifugáltunk, és a sejteket 100 mM-os foszfát-pufferben (pH=6.8) szuszpendáltuk (10 g baktérium/100 ml puffer). A baktériumok citokrómjainak redukálását 1-2 mg nátrium-ditionit, oxidálását néhány ammónium-perszulfát kristály adásával értük el. A redukált és oxidált minták differencia-spektrumát egy Shimadzu UV-3000 spektrofotométer kétsugaras üzemmódját használva készítettük el.

3.9. Fehérjeizolálás

A baktériumok szolubilis és membrán-fehérjéit alapvetően Thöny-Meyer és mtsai (1989) módszere szerint izoláltuk. 500 ml késői logaritmikus fázisig (OD_{600}=0.8-1.0) felnövesztett baktériumtenyészetet centrifugáltunk, és a sejteket foszfát-pufferrel (50 mM Na-foszfát, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.9% NaCl, pH=6.8) mostuk. A baktériumokat 5 ml 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) valamint 20-20 μg/ml DNázI-et és RNázA-t tartalmazó foszfát-pufferben szuszpendáltuk, és háromszori French press kezeléssel (12000 psi) feltártuk őket. A szuszpenzió kétszeri centrifugálásával (15000x g, 15 perc) eltávolítottuk a fel nem tárt sejteket, majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (145000xg, 90 perc), hogy a szolubilis és a membrán-fehérjéket elválasszuk. A kiülepített membránfrakciót 200-400 μl 1 mM PMSF-et tartalmazó foszfát-pufferben szuszpendáltuk. A minták fehérjekoncentrációját Bio-Rad próbával (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif, USA), standardként BSA-t (bovine serum albumin) alkalmazva határoztuk meg.

3.10. A fehérjeminták gélelektroforézise és specifikus festése

A fehérjemintákhoz (500-500 μg protein) azonos térfogatú 2x mintafelvivő puffert (0.125 M Tris-HCl, pH=6.8, 4% SDS, 20% glicerin, 10% ß-merkapto-etanol, 0.002% bróm-fenol-kék) adtunk, és az elegyeket 10 percig forraltuk. A denaturált fehérjéket 0.1% SDS-t tartalmazó, 15%-os poliakrilamid gélen választottuk el (Laemmli, 1970). A fehérjék molekulatömegét Pharmacia molekulatömeg standard segítségével határoztuk meg. Az elektroforézissel elválasztott fehérjéket Comassie festéssel (Comassie brillant blue R-250, Reanal, Budapest) tettük láthatóvá.

A prosztetikus csoportjukat denaturáló és redukáló körülmények között is megtartó hemoproteinek, azaz a kovalensen kötött hemet tartalmazó *c* -típusú citokrómok specifikus kimutatására Francis és Becker (1984) módszerét alkalmaztuk. A módszer azon alapul, hogy H_2O_2 és oxidálható szubsztrát, például valamilyen benzidin-származék jelenlétében a hem-csoport peroxidáz aktivitást mutat, és az oxidálódott hidrogéndonor, esetünkben az

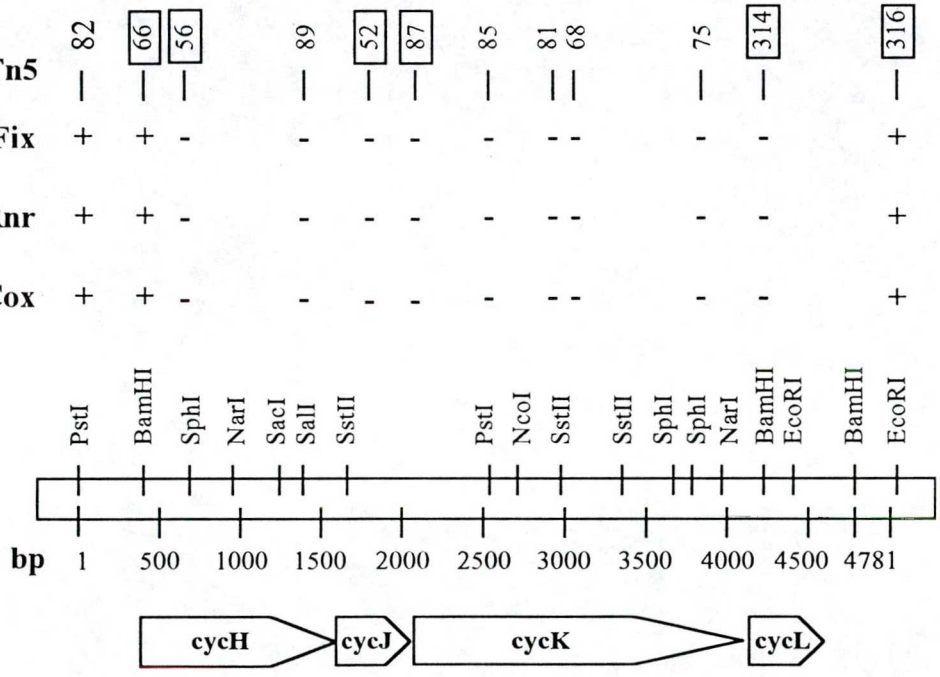
orto-dianizidin (3,3-dimetoxi-benzidin), színes, itt palackzöld, vízben oldhatatlan csapadékként kiválik a gélben.

Az elektroforézis után a géleket 30 percig 12.5%-os triklór-ecetsavban fixáltuk, 30 percig desztillált vízben mostuk, majd 120 percig festettük (1 mg/ml o-dianizidin, 0.06% H_2O_2, 0.05 M citromsav, pH=4.4).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *fix-14* régióban bekövetkező mutációk a *c*-típusú citokrómok hiányát eredményezik

Ahogy az 1.2. fejezetben kifejtettük, az előzetes vizsgálatok során kiderült, hogy a *fix-14* régióban kódolt fehérjék nem a két, redukciót végző enzim (nitrát-reduktáz, nitrogenáz) molibdén-tartalmú kofaktorának bioszintéziséhez szükségesek, hanem a feltételezések

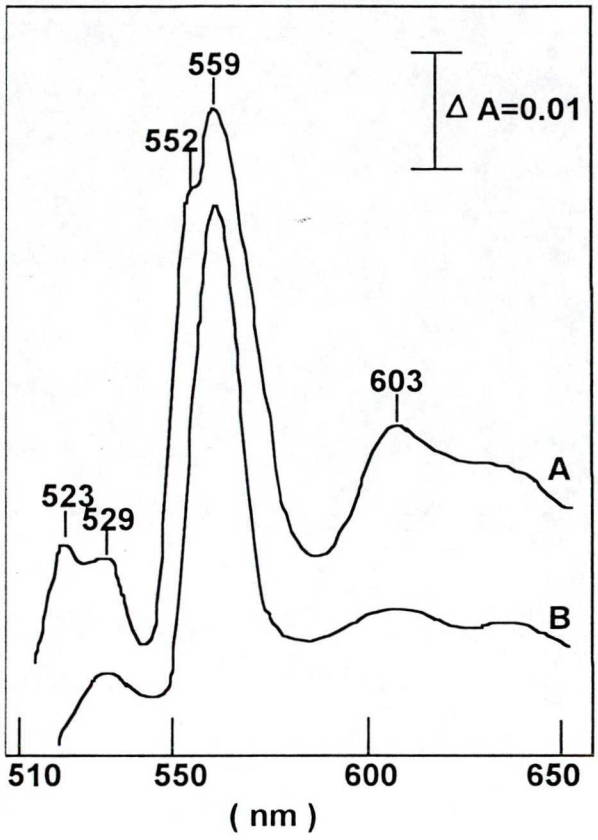


6. ábra. A *fix-14* régió fizikai-genetikai térképe. Az ábra felső részén függőleges vonalak jelzik a Tn5 transzpozonok beépülési helyét, amit szekvenálással határoztunk meg. Bekeretezéssel jelöltük azokat a mutánsokat, amelyeket részletesebben analizáltunk. A mutánsok szimbiotikus nitrogénkötő képessége (Fix), "respirációs" nitrát-reduktáz (Rnr), illetve citokróm *c* oxidáz (Cox) aktivitása látható középen. A szubklónozás során használt restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit tüntettük fel a méretskála felett. Az ábra alsó részén a régióban található gének elhelyezkedése látható.

szerint az enzimekhez vezető elektrontranszport-láncok közös elemei, vagy ilyen közös elemek szintézisében vesznek részt. Éppen ezért megvizsgáltuk, vajon a *fix-14* régióban létrehozott mutációk befolyásolják-e más elektrontranszport-láncok működését. Megállapítottuk, hogy az összes olyan Tn5 inszerciós mutáns, amely szimbiotikus körülmények között nem redukálja a légköri nitrogént, azaz Fix^- fenotípusú, szabadon élve nemcsak "respirációs" nitrát-redukcióra képtelen, hanem egy mesterséges elektron-donort, N,N,N',N'-tetrametil-para-feniléndiamint (TMPD) sem tud oxidálni. A TMPD oxidációja megfelelő elektron-akceptor, például aszkorbinsav jelenlétében a citokróm *c* oxidázok közreműködésével játszódik le. Az oxidáció elmaradása azt jelenti, hogy a régió mutánsai citokróm *c* oxidáz aktivitással sem rendelkeznek, Cox^- fenotípusúak (6. ábra).

A Cox^- fenotípusnak két fő oka lehet: (i) a citokróm *c* oxidázt kódoló génben bekövetkező mutáció, (ii) és/vagy a terminális oxidázhoz vezető elektrontranszport-lánc hiánya illetve hibás működése. Annak eldöntésre, hogy a *fix-14* régió mutánsaiban melyik esemény következett be, megvizsgáltuk a vad típusú valamint a mutáns baktériumok citokróm tartalmát, s néztük, hogy a mutációk hatására történt-e a sejtek citokróm-összetételében változás. A vizsgálatra használt módszer, az *in vivo* differenciaspektroszkópia alapja az, hogy a különböző citokrómok oxidált és redukált alakjai - az egyes citokrómokra rendkívül jellemző hullámhossz-tartományokban - eltérő fényelnyelési képességgel rendelkeznek, s ez a különbség optikai módszerekkel jól detektálható. A 7. ábrán az A jelű görbe a vad típusú AK631 törzs valamint a $Fix^+Rnr^+Cox^+$ fenotípusú mutánsok redukált mínusz oxidált differenciaspektrumát reprezentálja, míg a B jelű differenciaspektrum jellemző az összes vizsgált $Fix^-Rnr^-Cox^-$ mutánsra. A két görbét összehasonlítva számos különbséget fedezhetünk fel: A $Fix^-Rnr^-Cox^-$ mutánsok spektrumából hiányzik a *c*-típusú citokrómokra jellemző karakterisztikus csúcs 523 nm- nél, valamint az 552 nm-nél található váll. Hasonlóképp, a mutánsok citokróm aa_3 -tartalma, amelynek a 603 nm-nél látható csúcs az indikátora, erősen

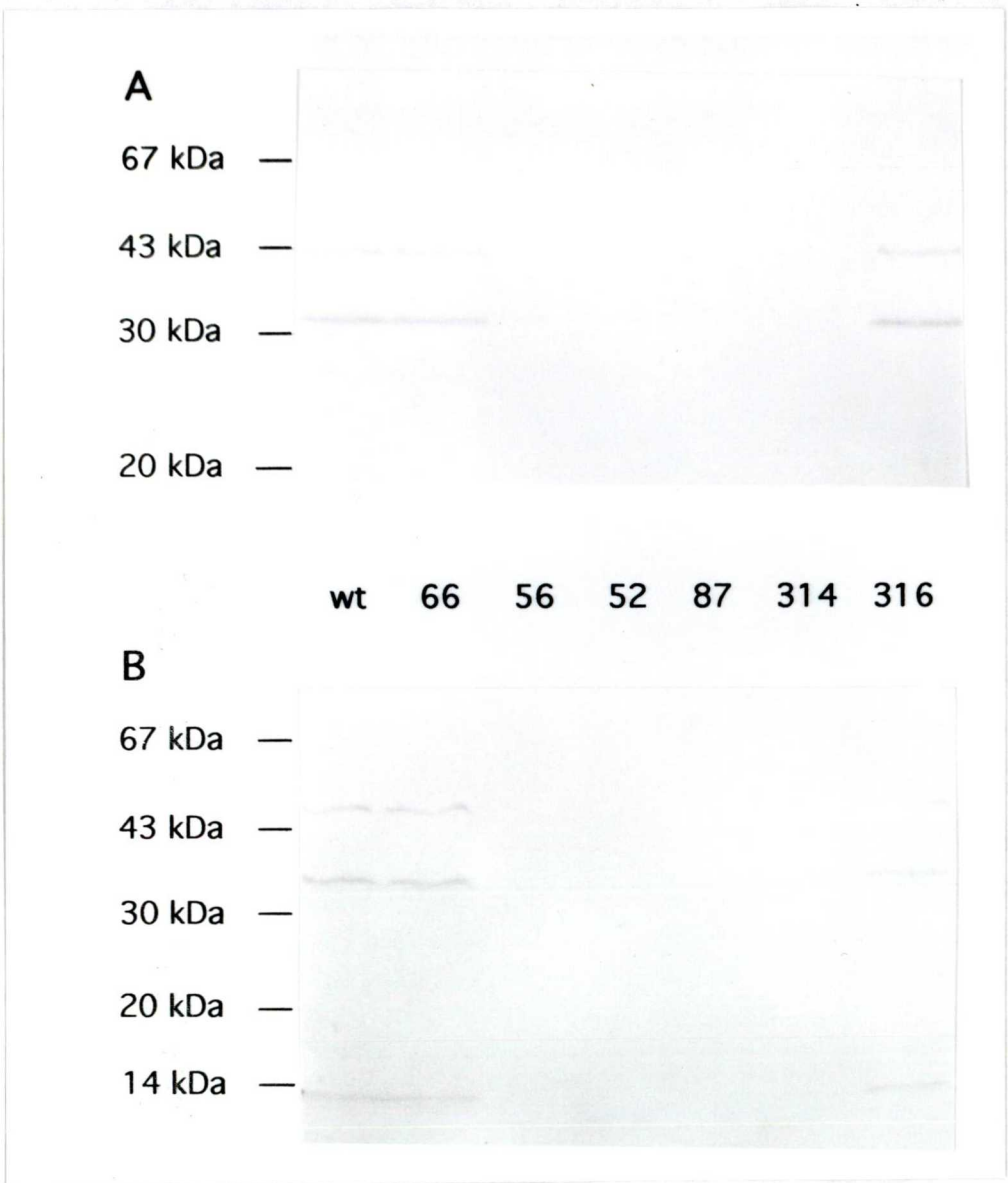
lecsökkent szintet mutat. Ezzel szemben a *b* -típusú citokrómok, melyekből az 559 nm-nél levő csúcs és az 529 nm-nél található váll származik, a vad és a mutáns fenotípusú baktériumokban hasonló mennyiségben fordulnak elő.



7. ábra. Aerob körülmények között felnövesztett *R. meliloti* sejtek *in vivo* differencia spektrumai (nátrium ditionit-redukált mínusz ammónium perszulfát-oxidált). A: AK631 (vad típusú törzs) és a 66-os valamint a 316-os számú Tn5 inszerciót hordozó homogenóta. B: az 56-os, 52-es, 87-es és 316-os Tn5 transzpozont tartalmazó mutánsok.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy *Rhizobium melilotiban* hányféle *c* -típusú citokróm fordul elő, s ezek közül melyek hiányoznak a *fix-14* régióban mutációt hordozó baktériumokból. E célból az aerob körülmények között felnövesztett vad típusú illetve mutáns sejtekből az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint izoláltuk a membrán-kötött valamint a szolubilis proteineket. A fehérjéket SDS-poliakrilamid-

gélelektroforézissel elválasztottuk, majd peroxidáz aktivitásuk alapján Francis és Becker (1984) módszerével megfestettük a hemoproteineket.



8. ábra. Kovalensen kötött hemet tartalmazó fehérjék az aerob körülmények között felnövesztett vad típusú (AK631) valamint a 6. ábrán bekeretezéssel jelölt *fix-14*::Tn5 mutáns baktériumokból izolált membrán- (A) illetve solubilis (B) fehérje frakciókban. A fehérjéket SDS-gélelektroforézissel választottuk el, majd a 3.10. fejezetben leírtak szerint festettük.

Az elektroforézis denaturáló körülményei között a fehérjék általában elvesztik a másodlagos kölcsönhatásokkal rögzített prosztetikus csoportjaikat így a citokrómok is a nem kovalensen kötött hemjeiket. Ezért ilyen körülmények között csak a *c*-típusú citokrómok festhetők meg, mert protohem IX prosztetikus csoportjuk kovalensen kötődik az apoproteinhez. A vad típusú *Rhizobium meliloti* sejtek membránfrakciójából két *c* -típusú citokrómot tudtunk kimutatni, melyek látszólagos molekulatömege 42 és 32 kDa volt (8. ábra). Amint az ábra B paneljében látható, a szolubilis fehérjék között három *c*-típusú citokróm volt detektálható, melyek látszólagos molekulatömege 48, 35 illetve 13 kDa-nak bizonyult. Az $Rnr^{-}Fix^{-}Cox^{-}$ fenotípusú mutánsokat reprezentáló, az 52-es, 56-os, 87-es és 314-es Tn5-inszerciót hordozó törzsekből mind a membrán-kötött, mind a szolubilis *c* -típusú citokrómok hiányoztak (8. ábra A és B panel). Ez az eredmény azt sugallta, hogy a mutációk olyan géneket érintenek, amelyek nem a citokróm *c* apoproteineket kódolják, hanem olyan fehérjéket, amelyek a *c* -típusú citokrómok biogenezisében vesznek részt.

4.2. A *c* -típusú citokrómok bioszintéziséhez szükséges gének vizsgálata

Ahhoz, hogy megtudjuk milyen biokémiai funkció(k) hiánya eredményezi a *fix-14* régió mutánsaiban az összes *c* -típusú citokróm hiányát, az egyik célravezető útnak tűnt a régióban található gének azonosítása, és az általuk kódolt fehérjék részletesebb analízise.

4.2.1. A *fix-14* régió génjeinek szubklónozása és szekvencia analízise

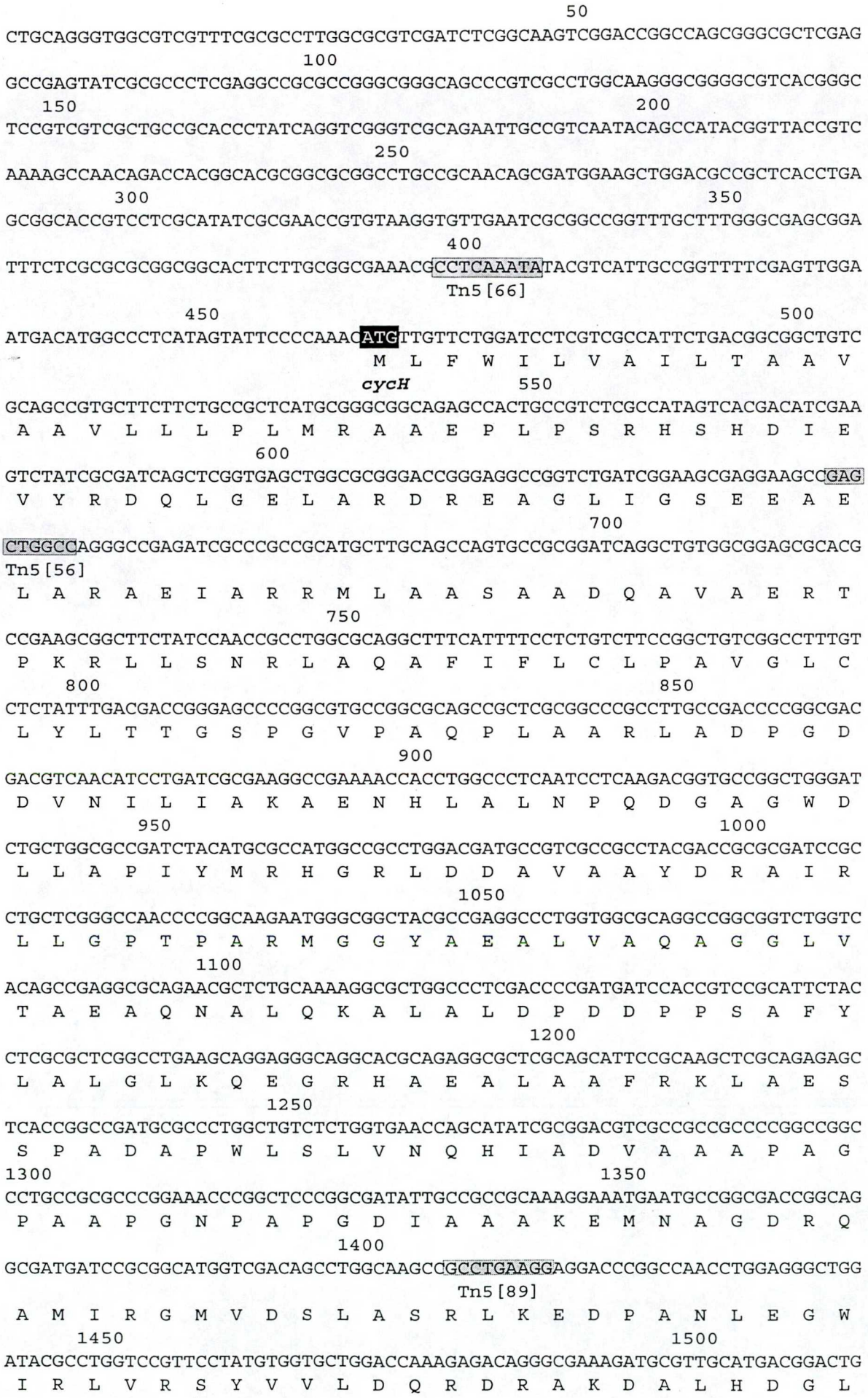
A *Rhizobium meliloti* *c*-típusú citokrómjainak szintéziséhez szükséges gének megismerése érdekében meg kellett határoznunk a korábban irányított Tn5 mutagenezis segítségével behatárolt *fix-14* régió nukleotidsorrendjét. E célból a pCHO8 és pPP381 plazmidokból a 6. ábrán látható restrikciós endonukleáz hasítóhelyeket felhasználva átfedő

fragmenteket szubklónoztunk M13mp18 és mp19 egyszálú fágvektorokba. A mutációk pontos helyének megállapítása valamint a régió teljesebb átfedése érdekében a Tn5 transzpozonok "lábait" és az inszerciókkal határos DNS-darabokat pUC19 vektorba építettük be. A szekvenálásra alapvetően a Sanger és munkatársai (1977) által kifejlesztett dideoxi láncterminációs módszert használtuk, melynek során M13- (univerzál és reverz) illetve Tn5-specifikus primerek alkalmazásával, az átfedő szubklónokat felhasználva, mindkét szálon meghatároztuk a *Rhizobium meliloti* kromoszóma egy 4781 bp-nyi darabjának nukleotid-sorrendjét (9. ábra).

A DNS-szekvenciát számítógépes módszerekkel analizáltuk: egyrészt azonosítottuk a lehetséges kódoló régiókat, az úgynevezett nyitott leolvasási kereteket (Open Reading Frame, ORF), másrészt egy, a már ismert *R. meliloti* gének szekvenciaadatai alapján összeállított kodonhasználati táblázat segítségével megvizsgáltuk, hogy mely ORF-ek rendelkeznek hasonló kodonhasználattal mint ami *R. meliloti*ra jellemző. Ezekkel a módszerekkel négy, egy irányba átíródó, tipikus *R. meliloti* kodonhasználatot mutató ORF-et sikerült azonosítanunk (6. és 9. ábra). Az ORF-eket nem előzte meg promóterszerű szekvencia, és nem követte semmiféle jellegzetes transzkripciós terminátor. Az *E. coli* konszenzus szekvenciát alapul véve, az ORF-ek előtt megkerestük a lehetséges riboszóma-kötő helyeket (9. ábra).

---

9. ábra. (következő lap) A *fix-14* régió nukleotid szekvenciája. A szekvencia alatt feltüntettük a régióban kódolt proteinek aminosav-sorrendjét (egybetűs kód) is. A csillag stop kodont jelképez. A startkodonok fekete háttér előtt fehér betűkkel vannak szedve. A lehetséges riboszóma-kötő helyeket aláhúzással jelöltük. A satírozott hátterű szekvenciák az adott Tn5 beépülésekor duplikálódott 9 bázispárt jelzik.


50
CTGCAGGGTGGCGTCGTTTCGCGCCTTGGCGCGTCGATCTCGGCAAGTCGGACCGGCCAGCGGGCGCTCGAG
100
GCCGAGTATCGCGCCCTCGAGGCCGCGCCGGGCGGGCAGCCCGTCGCCTGGCAAGGGCGGGGCGTCACGGGC
150
200
TCCGTCGTCGCTGCCGCACCCTATCAGGTCGGGTCGCAGAATTGCCGTCAATACAGCCATACGGTTACCGTC
250
AAAAGCCAACAGACCACGGCACGCGGCGCGGCCTGCCGCAACAGCGATGGAAGCTGGACGCCGCTCACCTGA
300
350
GCGGCACCGTCCTCGCATATCGCGAACCGTGTAAGGTGTTGAATCGCGGCCGGTTTGCTTTGGGCGAGCGGA
400
TTTCTCGCGCGCGGCGGCACTTCTTGCGGCGAAACGCCTCAAATATACGTCATTGCCGGTTTTCGAGTTGGA
Tn5[66]
450
500
ATGACATGGCCCTCATAGTATTCCCCAAACATGTTGTTCTGGATCCTCGTCGCCATTCTGACGGCGGCTGTC
M L F W I L V A I L T A A V
cycH
550
GCAGCCGTGCTTCTTCTGCCGCTCATGCGGGCGGCAGAGCCACTGCCGTCTCGCCATAGTCACGACATCGAA
A A V L L L P L M R A A E P L P S R H S H D I E
600
GTCTATCGCGATCAGCTCGGTGAGCTGGCGCGGGACCGGGAGGCCGGTCTGATCGGAAGCGAGGAAGCCGAG
V Y R D Q L G E L A R D R E A G L I G S E E A E
700
CTGGCCAGGGCCGAGATCGCCCGCCGCATGCTTGCAGCCAGTGCCGCGGATCAGGCTGTGGCGGAGCGCACG
Tn5[56]
L A R A E I A R R M L A A S A A D Q A V A E R T
750
CCGAAGCGGCTTCTATCCAACCGCCTGGCGCAGGCTTTCATTTTCCTCTGTCTTCCGGCTGTCGGCCTTTGT
P K R L L S N R L A Q A F I F L C L P A V G L C
800
850
CTCTATTTGACGACCGGGAGCCCCGGCGTGCCGGCGCAGCCGCTCGCGGCCCGCCTTGCCGACCCCGGCGAC
L Y L T T G S P G V P A Q P L A A R L A D P G D
900
GACGTCAACATCCTGATCGCGAAGGCCGAAAACCACCTGGCCCTCAATCCTCAAGACGGTGCCGGCTGGGAT
D V N I L I A K A E N H L A L N P Q D G A G W D
950
1000
CTGCTGGCGCCGATCTACATGCGCCATGGCCGCCTGGACGATGCCGTCGCCGCCTACGACCGCGCGATCCGC
L L A P I Y M R H G R L D D A V A A Y D R A I R
1050
CTGCTCGGGCCAACCCCGGCAAGAATGGGCGGCTACGCCGAGGCCCTGGTGGCGCAGGCCGGCGGTCTGGTC
L L G P T P A R M G G Y A E A L V A Q A G G L V
1100
ACAGCCGAGGCGCAGAACGCTCTGCAAAAGGCGCTGGCCCTCGACCCCGATGATCCACCGTCCGCATTCTAC
T A E A Q N A L Q K A L A L D P D D P P S A F Y
1200
CTCGCGCTCGGCCTGAAGCAGGAGGGCAGGCACGCAGAGGCGCTCGCAGCATTCCGCAAGCTCGCAGAGAGC
L A L G L K Q E G R H A E A L A A F R K L A E S
1250
TCACCGGCCGATGCGCCCTGGCTGTCTCTGGTGAACCAGCATATCGCGGACGTCGCCGCCGCCCCGGCCGGC
S P A D A P W L S L V N Q H I A D V A A A P A G
1300
1350
CCTGCCGCGCCCGGAAACCCGGCTCCCGGCGATATTGCCGCCGCAAAGGAAATGAATGCCGGCGACCGGCAG
P A A P G N P A P G D I A A A K E M N A G D R Q
1400
GCGATGATCCGCGGCATGGTCGACAGCCTGGCAAGCCGCCTGAAGGAGGACCCGGCCAACCTGGAGGGCTGG
Tn5[89]
A M I R G M V D S L A S R L K E D P A N L E G W
1450
1500
ATACGCCTGGTCCGTTCCTATGTGGTGCTGGACCAAAGAGACAGGGCGAAAGATGCGTTGCATGACGGACTG
I R L V R S Y V V L D Q R D R A K D A L H D G L

```
                                                    1550
AGGGCCTTCCCGGCAACGGGCGAGCAGGGGAAGCAGTTGCTGGCCTTGGCCCGGGAACTGGGGATCGACGCC
 R  A  F  P  A  T  G  E  Q  G  K  Q  L  L  A  L  A  R  E  L  G  I  D  A
          1600
GGCGGAGAGGCTGAATGACACGCAAGCAGAAAAGGTTGGCGATAATCGGCGGCGGCGTGGCATTTCTGACGG
 G  G  E  A  E  *
                M  T  R  K  Q  K  R  L  A  I  I  G  G  G  V  A  F  L  T
          cycJ                          1700
CCGCGGTGCTGCTCGTCATGTTCGCCTTCAGCCAGGCGGTAGCCTATTTCTATGTTCCGGGCGATCTTGCGA
A  A  V  L  L  V  M  F  A  F  S  Q  A  V  A  Y  F  Y  V  P  G  D  L  A
                1750
AGGCCGACGTCGCGCCGGGGACGCGTATCCGCCTCGGCGGACTTGTCGAGGCGGGCTCCGTCAAGCGCGGCG
K  A  D  V  A  P  G  T  R  I  R  L  G  G  L  V  E  A  G  S  V  K  R  G
                                                    1850
AGGGCAGGACCATCACCTTCACGGTCACGGATACGCTTGCGACCGTTCCGGTGACCTATACCGGCATCCTGC
   Tn5[52]
E  G  R  T  I  T  F  T  V  T  D  T  L  A  T  V  P  V  T  Y  T  G  I  L
                      1900
CCGACCTCTTCCGAGAGGGCCAGGGCGTGGTGGCCGAGGGTGCCTTCGTCGGCGGCAGCCCGGTTTTCGTTG
P  D  L  F  R  E  G  Q  G  V  V  A  E  G  A  F  V  G  G  S  P  V  F  V
  1950                                                2000
CGGACACCGTCCTCGCAAAGCATGATGAGACATACATGCCGAAGGATGTCGCCGACCGCCTCAAAGCGCAGG
A  D  T  V  L  A  K  H  D  E  T  Y  M  P  K  D  V  A  D  R  L  K  A  Q
                            2050
GCGTCACGCTCGGCGGGGAGGAAAACATCCGATGATCATCGAACTCGGGCACTATGCACTGGTTTTGGCGCT
G  V  T  L  G  G  E  E  N  I  R  *                    Tn5[87]
                               M  I  I  E  L  G  H  Y  A  L  V  L  A  L
                            cycK
2100                                                2150
CGCGACCGCGATCATCCAGGGCGTCCTGCCCGTCCTGGGGGGTGCGGCGCGGCGACCCTTCCTTGATGGGACT
  A  T  A  I  I  Q  G  V  L  P  V  L  G  V  R  R  G  D  P  S  L  M  G  L
                                  2200
GGCAGCAAACGCGGCGCTCGTCTGCTTCCTGCTGGTCGCTTTCTCCTTCGCAGTGCTGACATTCGCCTATGT
  A  A  N  A  A  L  V  C  F  L  L  V  A  F  S  F  A  V  L  T  F  A  Y  V
            2250
GACATCGGATTTCTCGGTCAAGAACGTCTGGGAGAACTCGCATTCCCTCAAACCGCTGATCTACAAGATCAC
  T  S  D  F  S  V  K  N  V  W  E  N  S  H  S  L  K  P  L  I  Y  K  I  T
                                        2350
CGGGGTCTGGGGAAACCATGAAGGCTCGATGCTTCTCTGGCTGCTGATTCTCGTCTTCTTTTCCGCGATGGT
  G  V  W  G  N  H  E  G  S  M  L  L  W  L  L  I  L  V  F  F  S  A  M  V
                  2400
GGCGCTCTTCGGCCGCAACCTGCCGGAGACGTTGAAGGCGAACGTCCTTGCAGTGCAGGCCTGGATCGCGAC
  A  L  F  G  R  N  L  P  E  T  L  K  A  N  V  L  A  V  Q  A  W  I  A  T
                                              2500
CGCCTTCGCGTTCTTCGTCCTGCTGACCTCCAATCCCTTCGCGCGGCTCGTGCCGGCACCGGGCGAGGGCAG
  A  F  A  F  F  V  L  L  T  S  N  P  F  A  R  L  V  P  A  P  G  E  G  R
                        2550
GGACCTCAACCCCGTGCTGCAGGATATCGGGCTCGCGATCCACCCGCCCTTGCTCTATCTCGGCTATGTCGG
    Tn5[85]
  D  L  N  P  V  L  Q  D  I  G  L  A  I  H  P  P  L  L  Y  L  G  Y  V  G
    2600                                              2650
CTTTTCCGTATGCTTCTCCTTCGCGGTCGCCGCGCTCATCGAGGGGCGGATCGATGCGGCCTGGGCGCGTTG
  F  S  V  C  F  S  F  A  V  A  A  L  I  E  G  R  I  D  A  A  W  A  R  W
                              2700
GGTGCGGCCGTGGACACTTGCCGCCTGGACCTTTCTTACCGCCGGCATCGCCATGGGCTCCTATTGGGCCTA
  V  R  P  W  T  L  A  A  W  T  F  L  T  A  G  I  A  M  G  S  Y  W  A  Y
          2750                                              2800
TTACGAGTTGGGCTGGGGCGGCTGGTGGTTCTGGGACCCGGTCGAAAACGCCTCCTTCATGCCTTGGCTCGC
  Y  E  L  G  W  G  G  W  W  F  W  D  P  V  E  N  A  S  F  M  P  W  L  A
```

```
2850
CGGAACGGCACTTCTGCACTCGGCCCTGGTCATGGAAAAGCGCGAAGCGCTGAAGATATGGACCGTGCTGCT
  G  T  A  L  L  H  S  A  L  V  M  E  K  R  E  A  L  K  I  W  T  V  L  L
                2900
GGCGATCATGACCTTTTCGCTGTCGCTGCTCGGCACGTTCCTGGTGCGCTCCGGCGTGCTGACATCCGTCCA
                                      Tn5[81]
  A  I  M  T  F  S  L  S  L  L  G  T  F  L  V  R  S  G  V  L  T  S  V  H
3000
TGCCTTCGCCACCGACCCGACCCGCGGCGTCTTCATTCTCGCCATCCTGATCGTCTTCATCGGCGGTGCGTT
  A  F  A  T  D  P  T  R  G  V  F  I  L  A  I  L  I  V  F  I  G  G  A  F
                     3050
TTCGCTCTTTGCCTTCCGTGCCTCCCATCTCAAGGCCGGGGGAATATTCGCACCGGTTTCGCGCGAGGGTGC
                           Tn5[68]
  S  L  F  A  F  R  A  S  H  L  K  A  G  G  I  F  A  P  V  S  R  E  G  A
3100                                                3150
GCTCGTCGTGAACAACCTGATCCTGACGACGGCCACGGCGACGGTGCTGACCGGCACGCTGTATCCGCTGGT
  L  V  V  N  N  L  I  L  T  T  A  T  A  T  V  L  T  G  T  L  Y  P  L  V
                           3200
ACTCGAAGCGCTGACCGGCGACAAAATTTCGGTCGGCGCGCCGTTCTTCAACATGACATTCGGTCTGCTGAT
  L  E  A  L  T  G  D  K  I  S  V  G  A  P  F  F  N  M  T  F  G  L  L  M
     3250                                                3300
GCTGCCGCTCATCGCCGTCGTTCCCTTCGGCCCGCTGCTTGCCTGGAAGCGCGGCGACCTTGCCGGTGCGGC
  L  P  L  I  A  V  V  P  F  G  P  L  L  A  W  K  R  G  D  L  A  G  A  A
                              3350
GCAGCGTCTGTTTGCGGCTGCCGCGCTCGGCCTGCTCGCCGCGGCGATCTGTTATTACGCGGTAAACGGTGG
  Q  R  L  F  A  A  A  A  L  G  L  L  A  A  A  I  C  Y  Y  A  V  N  G  G
           3400
CCCCGTCCTGGCTCCTTTCGGCCTCGGCCTCGGCGTCTACCTGATTCTGGGAGCGCTCACCGATCTGGTTCT
  P  V  L  A  P  F  G  L  G  L  G  V  Y  L  I  L  G  A  L  T  D  L  V  L
                                    3500
GCGCTCCGGTCTCGGCAAGGTGGCGGCGGGCGTCGCCTGGAGACGGCTTTCGGGCCTGCCGCGTTCGGCTTT
  R  S  G  L  G  K  V  A  A  G  V  A  W  R  R  L  S  G  L  P  R  S  A  F
                     3550                                3590      3600
CGGCACGGCGCTCGCCCATATCGGGCTCGGAATCACCCTGATCGGGATCGTCACGGTCACGGCTTTCGAAAC
  G  T  A  L  A  H  I  G  L  G  I  T  L  I  G  I  V  T  V  T  A  F  E  T
                                          3650
GGAAACGGTCGTCGAGATGAAACCGGGGGCGGTGGTCGATGTCGGGCGTTACAGCCTGCGTTTCGACGGCAT
  E  T  V  V  E  M  K  P  G  A  V  V  D  V  G  R  Y  S  L  R  F  D  G  M
                        3700
GCGTGAAGGGCGCGGGCCGAACTATACCGAGGATGCCGGCCATTTCACCGTCAGTCGAGGCGGTGTCGAGGT
  R  E  G  R  G  P  N  Y  T  E  D  A  G  H  F  T  V  S  R  G  G  V  E  V
  3750                                                3800
TACCGAAATCTGGTCGTCGAAACGGCTCTATTCAGCGCGGCGCATGCCGACGACCGAGGCCGGAATCCGGAC
  T  E  I  W  S  S  K  R  L  Y  S  A  R  R  M  P  T  T  E  A  G  I  R  T
                              3850
CTTCGGCCTGAGCCAGCTCTATGTATCCTTGGGCGACGACATGGCGGACGGCGGCATCGTCGTCCGCATCTG
  F  G  L  S  Q  L  Y  V  S  L  G  D  D  M  A  D  G  G  I  V  V  R  I  W
        3900                                                3950
GTGGAAACCACTGATCCTTTGCATCTGGGGCGGCGCGCTCGTGATGATGGCCGGCGGCGTCGTTTCGCTCAG
  W  K  P  L  I  L  C  I  W  G  G  A  L  V  M  M  A  G  G  V  V  S  L  S
                                    4000
CGACCGGCGCCTTCGCGTCGGCGCGCCGGCGCGTGCCAGAAAGGCGCTCGCCCTGGATCGCGATGATTTCAG
  D  R  R  L  R  V  G  A  P  A  R  A  R  K  A  L  A  L  D  R  D  D  F  R
                  4050                                              4100
GTCGGATCGACCAAAAATCATCAACGTGATCGATTCTAAAGGTTAGAGCGGGATGCGGGCGGAAAACCGTGC
  S  D  R  P  K  I  I  N  V  I  D  S  K  G  *
```

```
                                                    4150
ACACTTTTCCTCATCCCGCTCTGGGAGCTGCCAAATGATCCGGCTGCTGATCGCCCTCTTCCTTTTGCTGGC
                                        M  I  R  L  L  I  A  L  F  L  L  L  A
                                      cycL
4200
GTCCGTTGCCCCGGCGTTCGCCGTCAATCCGGACGAGGTGCTTGCGGATCCGGCGCTCGAAGCGCGTGCCCG
                                                 Tn5[314]
  S  V  A  P  A  F  A  V  N  P  D  E  V  L  A  D  P  A  L  E  A  R  A  R
                                                          4300
GGCGATCTCCGCCCAGCTCCGCTGCATGGTCTGCCAGAACCAGTCGATCGACGATTCGAACGCTGAACTCGC
  A  I  S  A  Q  L  R  C  M  V  C  Q  N  Q  S  I  D  D  S  N  A  E  L  A
                              4350
CAAGGATCTGCGGCTGCTCGTACGCGAGCGCCTGAAGAACGGCGATTCCGACGAAGCCGTGATCTCCTACGT
  K  D  L  R  L  L  V  R  E  R  L  K  N  G  D  S  D  E  A  V  I  S  Y  V
4400                                                      4450
CGTCTCACGCTACGGCGAATTCGTGCTCCTGAACCCTCGCCTTGAGGCCAAGACGCTCGTGCTGTGGGGCAT
  V  S  R  Y  G  E  F  V  L  L  N  P  R  L  E  A  K  T  L  V  L  W  G  M
                                    4500
GCCTGCCATTCTGCTCGTGGCCGGCATCACCCTCGTCGTGGCCGCAAGACGCCGCGGCGCAAGAGTTCCGGG
  P  A  I  L  L  V  A  G  I  T  L  V  V  A  A  R  R  R  G  A  R  V  P  G
        4550                                                    4600
CGCACCGCTTTCCGCCGAGGAAAAGGAAAGGCTGGACAGGCTCCTGCGGCCCTGATCTCAAGCAGGAGGCGC
  A  P  L  S  A  E  E  K  E  R  L  D  R  L  L  R  P  *
                                          4650
CAACGCGATTTGGGCGCATCCGTCCGCGCCTTGCAGCTCCACCGCAACATTACCAAAAATTCATCTGCCGGA
                  4700                                                    4750
CAGAACTCAGTAAGGTCCCGTCCGTTACATCTGACGGCATAGGCTGTTTCCTCCAGTCACAGCCACACGAGC
                            4781
GGGTTTCCGACGGTGAGGCCGTTGGATCC
```

Az első ORF a szekvencia 463. nukleotidjánál, a két különböző fenotípust okozó Tn5 inszerció, nevezetesen a 405. pozicióban levő Tn5[66] és a 645. nukleotidnál beépült Tn5[56] között kezdődik. Az ORF1 egy 379 aminosavból álló polipeptidet kódol, melynek számított molekulatömege 40072 Da. A második ORF feltételezett fehérjeterméke 150 aminosavat tartalmaz, molekulatömege 15789 Da, míg a 2028 bp hosszú harmadik ORF egy 676 aminosavból felépülő, 72643 Da molekulatömegű proteint kódol. A negyedik ORF két lehetséges, a 4085. és a 4139. nukleotidnál levő transzlációs iniciációs startponttal rendelkezik. Bár a második ATG kodon a harmadik ORF stopkodonját 64 bp távolságban követi, azonban az iniciációs kodon előtt 7 bp-nyira egy potenciális riboszóma-kötő helyet azonosítottunk, mely lehetővé teszi a riboszómák újrakötődését a mRNS-en, és a rövidebb protein keletkezését. A géntermék számítógépes analízise alapján úgy gondoljuk, hogy a 4. ORF a rövidebb, 16454 Da számított molekulatömegű fehérjét kódolja.

A második és harmadik ORF ATG iniciációs kodonja átfed az előttük levő ORF-ek TGA terminációs kodonjával. Ez az ATGA szekvencia szolgál transzlációs terminációs illetve iniciációs kodonként a *R. meliloti nodA* és *nodB* génjei esetén is, melyeknek nemcsak transzkripciója, hanem funkciója is kapcsolt, ugyanis az általuk kódolt fehérjék a Nod faktor bioszintézisének egymást követő lépéseit katalizálják (Török és mtsai, 1984; Röhrig és mtsai, 1994). A transzlációs terminációs és iniciációs kodonok ugyanilyen átfedése a *fix-14* régióban azt sugallja, hogy a hasonló bioszintetikus folyamatban résztvevő ORF-ek együtt íródnak át.

A velünk egyidőben, tőlünk függetlenül elvégzett vizsgálatok során Ritz és mtsai (1995) kimutatták, hogy a *Bradyrhizobium japonicumból* korábban izolált *cycH* gént (Ritz és mtsai, 1993) három ORF követi, melyek a *c*-típusú citokrómok biogeneziséhez szükségesek. A szekvencia-adatokat kicseréltük és összehasonlítottuk, s ez azt mutatta, hogy a két citokróm *c* bioszintézisben szerepet játszó régió homológ: négy nagyon hasonló, azonos elrendeződésű gént tartalmaz. A két faj géntermékeinek aminosav-sorrendjében az azonosság 40% (ORF1), 54% (ORF2), 64% (ORF3), és 56% (ORF4). Abból a célból, hogy a *c*-típusú citokrómok bioszintézisében szerepet játszó rhizobiális gének nevezéktana egységes legyen, a négy ORF-et mindkét fajban *cycH*, *cycJ*, *cycK* és *cycL* (cytochrom *c* biosynthesis) génnek neveztük el.

4.2.2. A *fix-14* régióban kódolt fehérjék számítógépes analízise

A nukleotid-sorrendből származtatott fehérjetermékeket számítógépes módszerekkel analizálva megállapíthatjuk, hogy találhatók-e bennük olyan jellegzetes szekvenciamotívumok, amelyek a fehérjék harmadlagos szerkezetére, lokalizációjára, illetve funkciójára utalhatnak. Az aminosav-sorrend összevetése adatbankokban tárolt szekvenciákkal feltárhatja a vizsgált protein hasonlóságát más, már ismert funkciójú fehérjékkel. Az ily módon nyert adatokból - melyek nem abszolút bizonyítékok, csak

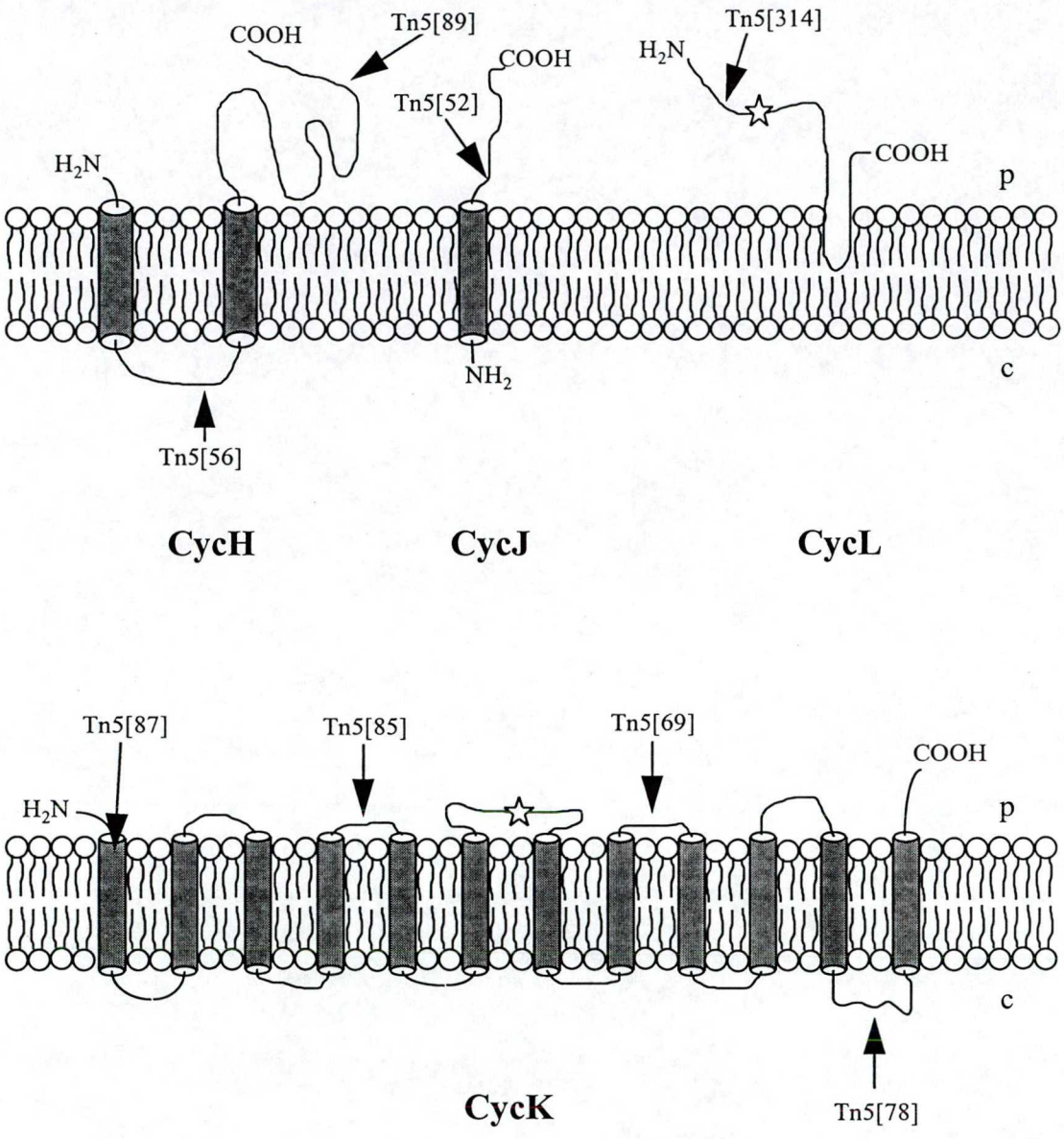
irányadó információk - következtethetünk az általunk tanulmányozott proteinek biokémiai szerepére, és célirányos kísérleteket tervezhetünk a prediktált funkció ellenőrzésére.

4.2.2.1. A *cycH, J, K,* és *L* gének membrán-kötött és periplazmatikus fehérjéket határoznak meg

A négy ORF által meghatározott fehérjeszekvenciákat a PC/Gene és UWGCG software-csomagok egyes programjai segítségével analizáltuk, melyek arra adtak választ, hogy található-e a vizsgált fehérjéknek olyan része, mely például DNS-hez kötődésben, vagy egy membránon át történő transzportban, stb. játszik szerepet.

A CycH fehérje hidrofobicitási görbéje (Eisenberg és mtsai, 1986; Rao és Argos, 1986) két hidrofób szakasz jelenlétét mutatta (10. és 11. ábra). A két hidrofób domén, amelyek a szekvencia 3. és 22., valamint 95. és 115. aminosavai között találhatóak, elegendő hosszúságú ahhoz, hogy a sejtmembránt átívelje, és a fehérjét a membránhoz lehorgonyozza. Ezzel összhangban, a bradyrhizobiális CycH protein topológiai vizsgálata is azt eredményezte, hogy a fehérje C-terminális része a periplazmába nyúlik, míg a két membránon átívelő szakasz közötti aminosavak egy citoplazmatikus hurkot képeznek (Ritz és mtsai, 1993). A CycJ fehérje hasonló analízise a protein elején, a 9. és a 29. aminosavak között egy erősen hidrofób régió jelenlétét tárta fel. Az, hogy a hidrofób domént bázikus aminosavak (Arg, Lys) előzik meg, és egy lehetséges szekréciós szignálpeptid hasítóhely követi, azt valószínűsíti, hogy a fehérje a periplazmatikus térbe transzportálódik (von Heijne, 1986). Ritz és mtsai (1995) vizsgálata szerint viszont a fehérje hidrofób N-terminális része nem hasítódik le a transzlokáció után, hanem a CycJ proteint a membránhoz horgonyozza (10. és 11. ábra). A *cycK* gén egy erősen hidrofób proteint kódol, melyben a különböző módszerekkel legalább 12 membránátívelő szakaszt lehetett azonosítani, azaz a CycK valószínűleg egy integráns membrán-fehérje. A CycL protein bázikus amino-terminálisát hidrofób aminosavak és egy potenciális szekréciós

szignálpeptid hasítóhely követi, ami a fehérje periplazmatikus lokalizációját sejteti. Egy karboxi-terminálisan található hidrofób domén a fehérjét kihorgonyozhatja a citoplazmatikus membrán külső felületéhez (10. és 11. ábra).



10. ábra. A *fix-14* régióban kódolt proteinek feltételezett membrán-topológiájának sematikus ábrázolása. Feltüntettük, hogy azoknak a Tn5 inszercióknak (azaz a Tn5-ön található transzlációs stop kodonoknak) a következtében, amelyek a 6. ábrán láthatók, hol szakad meg a fehérjelánc szintézise. A CycK és CycL fehérjékben csillaggal jelöltük a feltételezett hem-kötő szekvenciákat. c - citoplazma, p - periplazmatikus tér.

A négy ORF által meghatározott fehérjetermékek topológiai predikciója tehát azt mutatta, hogy a *cycHJKL* géncsoport olyan fehérjéket kódol, melyek vagy a citoplazmamembrán integráns részei, vagy a membrán külső felületéhez horgonyozva, illetve ahhoz asszociáltan találhatók. Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a fehérjék a *c* -típusú citokrómok érésének egy olyan lépésében vesznek részt, amely vagy a membránban, vagy a periplazmatikus térben játszódik le.

4.2.2.2. A *cycHJKL* géncsoport által kódolt proteinek bakteriális és organellum eredetű eredetű fehérjékhez hasonlítanak

A *cycH*, *J*, *K*, és *L* gének által meghatározott proteinek aminosav-sorrendjét a Blast programcsomag (Altschul és mtsai, 1990) segítségével összehasonlítottuk fehérje (Swiss-Prot Release 29.0, PIR Release 41.0) és lefordított nukleinsav (GenBank Release 84.0) adatbázisokban tárolt szekvenciákkal abból a célból, hogy ismert funkciójú fehérjékkel való hasonlóság esetén esetleg következtethessünk a fehérjék biokémiai szerepére.

---

11. ábra. (következő lap) A *fix-14* régióban kódolt proteinek összehasonlítása homológ bakteriális szekvenciákkal. A *R. meliloti* CycH fehérje illesztését az *E. coli* szekvenciákkal külön mutatjuk be (B), mert sokkal kevésbé hasonló az NrfG és CcmH proteinekhez, mint a többi CycH szekvenciához (A). A CycJ (C), a CycK (D), és CycL (E) fehérjék esetén az *nrf* és *ccm* gének termékei nem térnek el ily nagy mértékben a többi homológ proteintől, így együtt ábrázoljuk őket. A minden szekvenciában azonos aminosavakat kövér és dőlt betükkel jelöltük. A feltételezett membrán átívelő szakaszokat egyszer, a lehetséges szekréciós szignál szekvenciákat kétszer húztuk alá. Csillagokkal jelöltük a feltételezett hem-kötő motívumokat. Rm: *Rhizobium meliloti*, Bj: *Bradyrhizobium japonicum*, Rc: *Rhodobacter capsulatus*, Pd: *Paracoccus denitrificans*, Ec: *E. coli,* aa: aminosav.

A

```
RmCycH  MLFWILVAILTAAVAAVLLLPLMRAAEPLPSRHSHDIEVYRDQLGELARDREAGLIGSEE   60
BjCycH  MTLWFVFALMTVAAIFAVLWPLGRSARAQN--QGSEVVVYKDQLTEIERDLASGLIAAPE   58
PdCycH  M-FWIICAALAGVVPWPSPAPLLRRQARREPAAAYDLAIYRDQLREVERDLERGVIDAAD   59
RcCycH  MLFWIICATLVAAIAFALALTLLRPRGQGLPAGAQDLQVYRAQLAEVEKDLARGVLSPEE   60

RmCycH  AELARAEIARRMLAASAADQAVAERTPKRLLSNRLAQAFIFLCLPAVGLCLYLTTGSPGV  120
BjCycH  AEAARVEISRRLLAAAGSEPVSEPKSSLKWRRAAAVLALVGLPLVAIGVYMPLGSPRLQD  118
PdCycH  ASGLRVEIGRKVLAAD---GAPGNRPAAPGARRGWAALALLAALLGGAFLTYQGLGQPDS  116
RcCycH  AARSRVEISRRLLEADRALQAAGTAAAEAPRRGTVAAAALVVAALAGAFAIYDRLGAAGL  120

RmCycH  PAQPLAARLADPGDDVNILIAKAENHLAL-------------------------------  149
BjCycH  FPLAQRERGSGSGMAGSLENLVVQVEQHLEK-------------------------------  149
PdCycH  TDAPIALDRPGAGALRQPPQRDRCRGAGPQDPDAPSPCRICRPDPSAAEAVQK-------  169
RcCycH  PDAPLAGRLAEAETLYQARPDQAAAEATATAERKAAEAQAAAAGNPVPQPDPKFLELMER  180

RmCycH  -------NPQDGAGWDLLAPIYMRHGRLDDAVAAYDRAIRLLGPTPARMGG--YAEALVA  200
BjCycH  -------NPTDGRGWNVLAPVLERLGRFDDAVRAYRNSITYNGESPERRSD--LGEAISA  200
PdCycH  -------NPNDPRGLELLAEHEERLGNLVAAKDAQHRLVAARGESQRRGSGAAGRGLTIV  222
RcCycH  LRQAVAARPNDPQGLALLSENEMALGNFRAGWEAQRRLIALKGDRAEAADYTRLGELMTI  240

RmCycH  QAGGLVTAEAQNALQKALALDPDDPPSAFYLALGLKQEGRHAEALAAFRKLAESSPADAP  260
BjCycH  AAGGVVTAEAKTEFERAHALNADDPKANYFLGLAAEQDGRKDDAATIWRALLAKAPADAP  260
PdCycH  AAGGIISRDGEEAVAQALARVARNPQARFMAGLLHLQNGRPDQAFPVWARLLAEGPENAP  282
RcCycH  AAGGLVTADAEAAFAKALDMNPKDGLALFYVGLMMGQNDRPDRAFRLWDASLRASPPEAP  300

RmCycH  WLSLVNQHIADVAAAPAGPA-------------------APGNPAPGDIAAAKEMNAGDR  301
BjCycH  WRPLVQSSLVRVGGGTMPAL-----------------------SDETIAASKDMSEGDR  296
PdCycH  WIAPIRGSIQDSGLVCRPPGLYPARTEPLVWTPGMPSLPAMPGPDADDGRAEE-MTAEER  341
RcCycH  WVAEIAQGIETLAWLAGEQDY-------------TPPLPVPAGPSAEQMQAAEGMAPADR  347

RmCycH  QAMIRGMVDSLASRLKEDPANLEGWIRLVRSYVVLDQRDRAKDALHDGLRAFPATGEQGK  361
BjCycH  GAMVRGMVERLATRLKQNSDDVEGWLRLVRAYLVMGDRDKAVGASSDARQAVAKDTERLR  356
PdCycH  QEMVEGMVKGLETRLATQDGTAEEWARLISSLPVIGQKDHAADILAEARRQFAGNGRRWR  401
RcCycH  LAMIRGMVENLNARLANEGGSAEDWTKLISSLRVLGEADRAAAIATEARTKFTGRAGDLA  407

RmCycH  QLLALARELGIDAGGEAE  379
BjCycH  QLNEGLKTLGLDG      369
PdCycH  SSEAAAKQASLE       413
RcCycH  KIEAATQVPLGTIGAAP  424
```

B

```
RmCycH   MLFWILVAILTAAVAAVLLLPLMRAAEPLPSRHSHDIEVYRDQLGELARDREAGLIGSEE  60

EcNrfG                              MKQPKIPVKMLTTLTILMVFLCVGSYLLSPKWQAVRA  37
RmCycH   AELARAEIARRMLAASAADQAVAERTPKRLLSNRLAQAFIFLCLPAVGLCLYLTTGSPGV 120
EcCcmH         M-141 aa-GKRAGYVVYLPGIVVALIVAGVSYYQTGNYQQVKIWQQATAQAPA 186

EcNrfG   EYQRQRDPLHQFASQQTPEAQLQALQDKIRANPQNSEQWALLGEYYLWQNDYSNSLLAYR  97
RmCycH   PAQPLAARLADPG--DDVNILIAKAENHLALNPQDGAGWDLLAPIYMRHGRLDDAVAAYD 178
EcCcmH   LLDRALDPKADPLNEEEMSRLALGMRTQLQKNPGDIEGWIMLGRVGMALGNASIATDAYA 246

EcNrfG   QALQLRGENAELYAALATVLYYQASQHMTAQTRAMIDKALALDSNEITALMLLASDAFMQ 157
RmCycH   RAIRLLGPTPARMGGYAEALVAQAGGLVTAEAQNALQKALALDPDDPPSAFYLALGLKQE 238
EcCcmH   TAYRLDPKNSDAALGYAEALTRSSDPNDNRLGGELLRQLVRTDHSNIRVLSMYAFNAFEQ 306
```

Szegedi Tudományegyetem Klinikai Központ Könyvtár SZEGED

```
EcNrfG   ANYAQAIELWQKVMDLNSPRVNRTQLVESINMAKLLQRRLD                    198
RmCycH   GRHAEALAAFRKLAESS-PADAPWLSLVNQHIADVAAAPAGPAAPGN-35 aa      379
EcCcmH   QRFGEAVAAWEMMLKLL-PANDTRRAVIERSIAQAMQHLSPQESK              350
```

C

```
RmCycJ   MT-RKQKRLAIIGGGVAFLTAAVLLVMFAFSQAVAYFYVPGDL------AKADVAPGTRI  53
BjCycJ   MT-RKQRRMTIIGGSLAVLALAAALVLNALRDSIVFFSTPTMV------AEKHVQAGKRF  53
EcCcmE   MNIRRKNRLWIACAVLAGLALTIGLVLYALRSNIDLFYTPGEILYGKRETQQMPEVGQRL  60

RmCycJ   RLGGLVEAGSVKRG-EGRTITFTVTDTLATVPVTYTGILPDLFREGQGVVAEGAFVGGSP 112
BjCycJ   RLGGLVQPGSLQRG-DNLAVSFEVADGNAKLPVAYKGILPDLFREGQGVVAEGAL-DANG 111
EcCcmE   RVGGMVMPGSVQRDPNSLKVTFTIYDAEGSVDVSYEGILPDLFREGQGVVVQGELEKGNH 120

RmCycJ   VFVADTVLAKHDETYMPKDVADRLKAQGVTLGGEENIR                       150
BjCycJ   VFKADTVLAKHDETYMPKDVADALKKQGHWKDDYGGKASDGVKPAATTAQGNPQGAVR   169
EcCcmE   IL-AKEVLAKHDENYTPPEVEKAMEANHRRPASVYKDPAS                    159
```

D

```
RmCycK   MIIELGHYALVLALATAIIQGVLPVLGVRRGDPSLMGLAANAALVCFLLVAFSFAVLTFA  60
BjCycK   VIAESGHYALVLALGLALIQSIVPLIGARLRDDALMSVARSTALAQLLFVGASFVALVML  60
RcCcl1   MIVETGHFALILALCVALVQAVIPLVGAQKGWSGWMAVATPAALAQFGLIAIAFAALTYA  60
EcNrfE                    VLTPLTAFAGVRLRWPAMMRLTCIGILAQFALLLLAFGVLTYC  43
EcCcmF   MMPEIGNGLLCLALGIALLLSVYPLWGVARGDARMMASSRLFAWLLFMSVAGAFLVLVNA  60

RmCycK   YVTSDFSVKNVWENSHSLKPLIYKITGVWGNHEGSMLLWLLILVFFSAMVALFGRNLPET 120
BjCycK   HVNSDFSVANVYENSHSMKPLLYKITGVWGNHEGSMLLWVSILALFGGLVAAFGNNLPLS 120
RcCcl1   FVTSDFSLKLVYENSHTDKPMLYKVTGVWGNHEGSMLLWVLILAMFGAAAAAFGGALPER 120
EcNrfE   FLISDFSVIYVAQHSYSLLSWELKLAAVWGGHEGSLLLWVLLLSAWSALFAWHYRQQTDP 103
EcCcmF   FVVNDFTVTYVASNSNTQLPVWYRVAATWGAHEGSLLLWVLLMSGWTFAVAIFSQRIPLD 120

RmCycK   LKANVLAVQAWIATAFAFFVLLTSNPFAR-LVPAPGEGRDLNPVLQDIGLAIHPPLLYLG 179
BjCycK   LRAHVLAVQAWIASAFYLFILVTSNPFLR-IANPPIEGRDLNPVLQDIGLAVHPPMLYLG 179
RcCcl1   LRARVLAVQGTIGVAFLVFVLFTSNPFLR-LEEAPFNGRDMNPLLQDPGLAFHPPFLYLG 179
EcNrfE   LFPLTLAVLSLMLAALLLFVVLWSDPFVRIFPPA-IEGRDLNPMLQHPGLIFHPPLLYLG 162
EcCcmF   IVARVLAIMGMVSVGFLLFILFTSNPFSRTLPNFPIEGRDLNPLLQDPGLIFHPPLLYMG 180

RmCycK   YVGFSVCFSFAVAALIEGRIDAAWARWVRPWTLAAWTFLTAGIAMGSYWAYYELGWGGWW 239
BjCycK   YVGFSISFSFAIAALMEGRIDAAWALWVRPWTLVAWIFLTLGIAMGSYWAYYELGWGGWW 239
RcCcl1   YVGLSMAFSFAVAALIEGRVDAAWARWVRPWTLAAWIFLTIGIALGSWWAYYELGWGGFW 239
EcNrfE   YGGLMVAASVALASLLRGEFDGACARICWRWALPGWSALTAGIILGSWWAYCELGWGGWW 222
EcCcmF   YVGFSVAFAFAIASLLSGRLDSTYARFTRPWTLAAWIFLTLGIVLGSAWAYYELGWGGWW 240
                                                          *****

RmCycK   FWDPVENASFMPWLAGTALLHSALVMEKREALKIWTVLLAIMTFSLSLLGTFLVRSGVLT 299
BjCycK   FWDPVENASLMPWLAGTALLHSALVMEKRNALKVWTILLSILTFSLSLLGTFLVRSGVIT 299
RcCcl1   FWDPVENASLMPWLLAAALLHSAIVVEKREALKSWTILLAIMAFGFSLIGTFLVRSGVIS 299
EcNrfE   FWDPVENASLLPWLSATALLHSLSLTRQRGIFCHWSLLLAIVTLMLSLLGTLIVRSGILV 282
EcCcmF   FWDPVENASFMPWLVGTALMHSLAVTEQRASFKAWTLLLAISAFSLCLLGTFLVRSGVLV 240
         ***

RmCycK   SVHAFATDPTRGVFILAILIVFIGGAFSLFAFRASHLKAGGIFAPVSREGALVVNNLILT 359
BjCycK   SVHAFATDPTRGVFILLILCLFIGGSLSLFAGRATSLKQGGLFAPISREGALVLNNLLLT 359
RcCcl1   SVHSFANDPERGVFILFILAFFTGGALTLYAARASEMQAKGLFSMVSRESALVMNNVLLA 359
EcNrfE   SVHAFALDNVRAVPLFSLFALISLASLALYGWRARDGGPAVHFSGLSREMLILATLLLFC 342
EcCcmF   SVHAFASDPARGMFILAFMVLVIGGSLLLFAARGHKVRSRVNNALWSRESLLLANNVLLV 360
```

```
RmCycK   TATATVLTGTLYPLVLEALTGDKISVGAPFFNMTFGLLMLPLIAVVPFGPLLAWKRGDLA 419
BjCycK   VACAVVLFGTLYPLAMEMLADFKMSVGAPFYNLTFAPLFALLLLAVPFGPMLAWKRGDLL 419
RcCcl1   VAALVVFTGTVWPLIAELFWDRKLSVGAPFFEKAFTPFMVGLALLLPLGSMMPWKRASLG 419
EcNrfE   AVLLIVLVGTLYPMIYGLLGWGRLSVGAPYFNRATLPFGLLMLVVIVLATFVSGKR---- 398
EcCcmF   AAMLVVLLGTLLPLVHKQLGLGSISIGEPFFNTMFTWLMVPFALLLGVGPLVRWGRDRPR 420

RmCycK   GAAQRLFAAAALGLLA-AAICYYAVNGGPVLAPFGLGLGVYLILGALTDLVLRSGLGKVA 478
BjCycK   GVTQRLLAAGVAGLVV-VAIVWAWTRGGSALAPLAIGLGVFVIAGAVTDLVERTGLVRLP 478
RcCcl1   KLVRPLLPALVLTLAV-LALVWVMATGRPMLALGAAGLGAWILFGALAEIWQRAG--RTP 476
EcNrfE   ------------------------------------------------------------ 398
EcCcmF   KIRNLLIIAFISTLVLSLLLPWLFESKVVAMTVLGLAMACWIAVLAIAEAALRIS----- 475

RmCycK   AGVAWRRLSGLPRSAFGTALAHIGLGITLIGIVTVTAFETETVVEMKPGAVVDVGRYSLR 538
BjCycK   LATALQRARGLPRSAWGAALAHAGLGVALIGIVCETTWNSEYIATMKRSDVAHVAGYDVK 538
RcCcl1   G-----RILRLPRADWGKAFAHGGLGIVFAGVGLLMAGQVEDIRVAKAGDSFEVAGYTIT 531
EcNrfE   ------------VQLPALVAHAGVLLFAAGVVVSSVSRQEISLNLQPGQQVTLAGYTFR 445
EcCcmF   ------RGTKTTFSYWGMVAAHLGLAVTIVGIAFSQNYSVERDVRMKSGDSVDIHEYRFT 529

RmCycK   FDGMREGRGPNYTEDAGHFTVSRGGVEVTEIWSSKRLYSARRMPTTEAGIRTFGLSQLYV 598
BjCycK   LDGLFQRQGPNYREMIAEFNVSRDGETLSVMTPSKRSFTTRGSSTTEAALLTRGASQLYI 598
RcCcl1   LVSVEDVPGPNFTAKTATMEVRQGGKLVATLHPEKRIYPVQAMPTTEADIDNGFWRDVYL 591
EcNrfE   FECLDLQAKANYTSEKAIVALFDHQQRIGELTPERAFYEARRQQMMEPSIRWNGIHDWYA 505
EcCcmF   FRDVKEVTGPNWRGGVATIGVTRDGKPETVLYAEKRYYNTAGSMMTEAAIDGGITRDLYA 589

RmCycK   SLGDDMADGGIVVRIWWKPLILCIWGGALVMMAGGVVSLSDRRLRVGAPARARKALALDR 658
BjCycK   SLGDANAEGAIAVRIYHKPLVLLIWWGPVLMAFGGVLSLSDRRLRVGAPKPARAKQRLQP 658
RcCcl1   VIGDPQEGGGWAVRTYVKPFANWIWAGCLLMAFGGGLSLTDRRYRSAAGARRATVADAVA 651
EcNrfE   VMGEKTGPDRYAFRLYVQSGVRWIWGGGLLMIAGALLSGWRGKKRDE              552
EcCcmF   ALGEELENGAWAVRLYYKPFVRWIWAGGLMMALGGLLCLFDPRYRKRVSPQKTAPEAV   647

RmCycK   DDFRSDRPKIINVIDSKG                                          676
BjCycK   AE                                                          660
RcCcl1   AE                                                          653
```

E

```
RmCycL   MIRLLIALFLL-LASVAPAFAVNPDEVLADPALEARARAISAQLRCMVCQNQSIDDSNAE  59
BjCycL   MRRMMAAFVALALLASPAVHAVQPDEIMSDPAKETRARDLSRELRCMVCQNQSIDDSDAP  60
RcCcl2   MLKRLLLLLVLA----TPVHAVQPDEVLSDPGLEARARQISQVLRCPVCQGENIDESNAG  56
EcCcmH   M-RFLLGVLML-MISGSALATIDVLQ-FKDEAQEQQFRQLTEELRCPKCQNNSIADSNSM  57
EcNrfF   MNKGLLTLLLL-FTCFAHAQVVDTWQ-FANPQQQQQALNIASQLRCPQCQNQNLLESNAP  58
                                                      ******

RmCycL   LAKDLRLLVRERLKNGDSDEAVISYVVSRYGEFVLLNPRLEAKTLVL-WGMPAILLVA-G 117
BjCycL   LARDLRLLVRERIAGGDSNSQVLDFLVARYGEFVLLKPRFERQTLLL-WLLGPLLLTG-G 118
RcCcl2   VSRDLRLAVRERLVAGDSDAQVIDYIKDRFGEYVLFEPERRGANLILYWIGPAVLVVALG 116
EcCcmH   IATDLRQKVYELMQEGKSKKEIVDYMVARYGNFVTYDPPLTPLTVLL-WVLPVVAIGI-G 115
EcNrfF   VAVSMRHQVYSMVAEGKNEVEIIGWMTERYGDFVRYNPPLTGQTLVL-WALPVVLLLL-M 116

RmCycL   ITLVVAA-RRRGARVPGAPLSAEEKERLDRLLRP                           150
BjCycL   GLALWLQIRRRSRSGADLPAPPLTPDEEARLAALMSDEAKSS                   160
RcCcl2   GIFLWLRGRRREEEPVPVLSAEEEARLKDLLKD                           149
EcCcmH   GWVIYARSRRRVRVVPE-AFPEQSVPE-209 aa                          350
EcNrfF   ALILWRVRAKR                                                 127
```

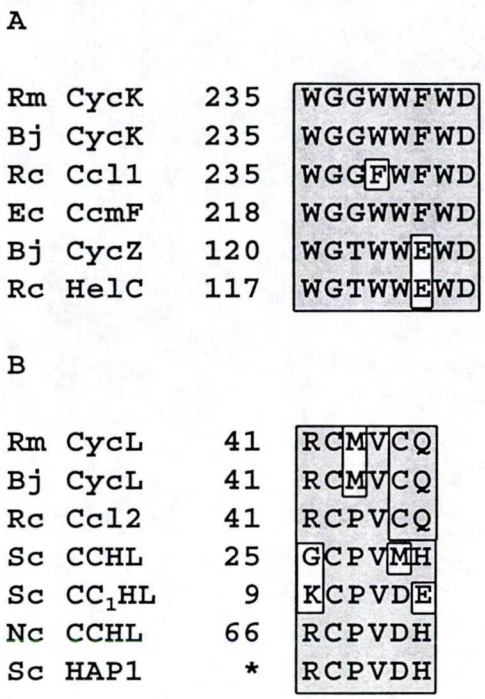
Bár mind a négy protein szignifikáns hasonlóságot mutatott főleg bakteriális eredetű fehérjékhez (11. A, B, C, D és E ábra), közöttük azonban nem volt olyan, melynek a biokémiai funkciója ismert lett volna. A homológ bradyrhizobiális fehérjék mellett a közeli filogenetikai rokonságban álló *Rhodobacter capsulatus* Ccl1 és Ccl2 fehérjéi, melyek szintén a *c*-típusú citokrómok bioszintéziséhez szükségesek (Beckman és mtsai, 1992), mutatták a legnagyobb hasonlóságot a CycK és a CycL proteinekhez (53.5% illetve 53.7% aminosav-azonosság). A *ccl* operonban csak ez a két cisztron található, nem előzi meg őket *cycH*- és *J*-szerű szekvencia. A *cycJ* génhez hasonló DNS-szakaszt *Rhodobacter capsulatusban* még nem azonosítottak, viszont nemrég izolálták a kromoszóma egy távolabbi pontján elhelyezkedő *cycH* gént (Lang és mtsai, 1996). A *Paracoccus denitrificans cycH* génjének szekvenciáját velünk egyidőben közölte Page és Ferguson (1995). A két rokon fehérje aminosav sorrendje 32.5%-ban (*R. capsulatus*), illetve 31 %-ban (*P. denitrificans*) azonos volt a R. meliloti CycH proteinjének szekvenciájával.

Az adatbankokban két olyan *E. coli* géncsoportot azonosítottunk, melyek a CycH, J, K, és L proteinekhez hasonló fehérjék termeléséért felelősek. Az *nrf* operon által kódolt proteinek a formiát-függő nitrit-redukciós út, és ezen belül a négy hem prosztetikus csoportot tartalmazó citokróm c_{552} nitrit-reduktáz (az *nrfA* gén terméke) aktivitásához szükségesek (Darwin és mtsai, 1993; Hussain és mtsai, 1994). A CycH, CycK, és CycL proteinek aminosav-sorrendje, valamint az *nrf* operonban kódolt fehérjék szekvenciája 21.4% (CycH-NrfG), 43.8% (CycK-NrfG), és 36.9% (CycL-NrfE) azonosságot mutatott, míg CycJ-szerű polipeptidet az *nrf* géncsoport nem határoz meg. A másik géncsoportot egy olyan DNS-szakaszon azonosították, melyet az *E. coli* genomprogram során szekvenáltak meg (GenBank Release 84.0, accession number U00008, beküldő K.Robison). Ha ezt a DNS-régiót eltávolítják az *E. coli* genomból, akkor az anaerob, nem fermentatív körülmények között növesztett, terminális elektronakceptorként nitrátot vagy nitritet használó sejtekből nem lehetett kimutatni az ilyen körülmények között indukálódó *c*-típusú citokrómokat (Thöny-Meyer és mtsai, 1995). A *ccm*-nek (citochrome *c* maturation)

elnevezett operonban kódolt fehérjék nemcsak a CycH, CycJ, CycK, és CycL proteinekhez, hanem nitrát- és nitrit-reduktázok különböző alegységeihez (mint például egy négy hemet tartalmazó citokróm *c*), valamint a *Bradyrhizobium japonicumban* a *c*-típusú citokrómok bioszintézisében szerepet játszó *cycVWXZ*, és *tlpB* gének (Ramseier és mtsai, 1991) fehérjetermékeihez is hasonlóságot mutatnak. A CycJ és CycK proteinek valamint a *ccm* operonban kódolt CcmE és CcmF fehérjék aminosav-sorrendje 41, illetve 44.5%-ban azonos. A *E. coli ccmH* génje által kódolt protein amino-terminális része 33.3%-os hasonlóságot mutatott a CycL fehérjéhez, míg karboxi-terminális részének aminosav-sorrendje 23.3%-ban azonos volt a *cycH* gén által kódolt polipeptid egy 190 aminosav hosszúságú darabjával. Az *E. coli* fehérje megfelelő szakaszának, valamint a rhizobiális proteineknek a hidrofobicitási görbéje hasonló lefutású volt, így a fehérjék topológiai predikciója is hasonlónak bizonyult. Érdekes volna megtudni, hogy a *R. melilotiban* két protein által ellátott funkció(ka)t az *E. coli* sejtekben ez az egy fehérje látja-e el. A baktériumok között a légzési lánc tekintetében az *E. coli* atipikusnak tekinthető, ugyanis (micro)aerob légzési láncai nem tartalmaznak *c* -típusú citokrómokat, azaz a molekuláris oxigén redukálásában citokróm *c* oxidázok nem, csak ubikinol oxidázok vesznek részt. Anaerob körülmények között a nitrát-respiráció és a denitrifikáció folyamatában viszont az elektronok citokróm *c* fehérjéken keresztül is áramlanak. Mivel a *c* -típusú citokrómok nem állandó alkotóirészei az *E. coli* sejteknek, ezért nem meglepő, hogy a csak adott körülmények között átíródó operonok mind a citokróm *c* apoproteineket, mind a valószínűleg az azok éréséhez szükséges fehérjéket kódolják.

Számos eukarióta organizmusról kimutatták, hogy extrakromoszómális genomja(i) a CycK fehérjéhez hasonló proteineket kódol(nak) (Ohyama és mtsai, 1986; Oda és mtsai, 1992; Schuster és mtsai, 1993), azonban nincs köztük az élesztő, melyben a legintenzívebben tanulmányozták a *c*-típusú citokrómok érését (Gonzales és Neupert, 1990). A mitokondriális proteinek aminosav-sorrendje egy 145 aminosavnyi szakaszon 49%-ban, míg a kloroplasztiszokban kódoltaké 130 aminosav hosszúságú darabon 25%-

ban volt azonos a CycK fehérje szekvenciájával. Ez a hasonlóság a protein egy aromás oldalláncú aminosavakban gazdag, a 11.D ábrán csillagokkal jelölt szakasza (WGGWWFWD) körül alakult ki. A különböző bakteriális fehérjéknek is ez a legkonzerválódottabb része, a domént alkotó 17 aminosav az összes fehérjében ugyanaz, csak a *Rhodobacter capsulatus* Ccl1 fehérjéje tartalmaz egy konzervatív Trp→Phe cserét.



12. ábra. Feltételezett hem-kötő motívumok. A szekvenciák bal oldalán levő számok jelzik a mintázat pozicióját az adott fehérjében. * A motivum hétszer ismétlődik a HAP1 (haem activated protein) fehérjében. Rm, Bj, Rc, Ec: ld 11. ábra. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Nc: *Neurospora crassa*, CC(1)L: citokróm *c* (c_1) hem liáz.

Topológiai predikciók és vizsgálatok szerint a fehérjéknek ez a doménje két membránátívelő szakasz között a periplazmatikus oldalon található. A *B. japonicum* és a *R. capsulatus* egy másik, szintén a *c* -típusú citokrómok bioszintézisében szerepet játszó géncsoportja (*cycVWXZ-tlpB* illetve *helABCDX*) többek között egy ABC-transzporter (ATP-binding casette containing) alegységeit kódolja (Ramseier és mtsai, 1991; Beckman

és mtsai, 1992). Ennek egyik alegysége, a CycZ illetve a *helC* gén fehérjeterméke szintén tartalmaz egy ehhez nagyon hasonló motívumot (WGTWWEWD). A feltételezések szerint ez a szekvencia mindkét fehérjecsaládban hem-kötésre szolgál (Beckman és mtsai, 1992), azonban ennek kísérletes bizonyítása még nem történt meg.

A CycL-jellegű fehérjék leginkább konzerválódott szakasza, a 11.E ábrán csillagokkal jelölt LRCXXCQ szekvencia szintén egy feltételezett hemkötő hely (Thöny-Meyer és mtsai, 1994). A motívum (12.B ábra) nemcsak ahhoz a helyhez hasonló, ahova a *c* -típusú citokrómokban a hem kovalensen kötődik (CXXCH), hanem pl a mitokondriális citokróm *c* hem liázokban található szekvenciamintázathoz is (Dumont és mtsai, 1987; Nicholson és mtsai, 1989). Számos fehérjének, köztük például az élesztő hem-aktiválta szabályozó proteinjének (HAP1, Creusot és mtsai, 1988; Pfeifer és mtsai, 1989), és az emlős mitokondriumok delta-amino-levulinsav szintázának (Lathrop és Timko, 1993) aktivitását hem befolyásolja. Ezek a proteinek szintén tartalmaznak egy vagy több, a fenti mintázathoz hasonló, úgynevezett hem-regulációs motívumot, melyről Zhang és Guarente (1995) kimutatta, hogy valóban megköti a szabad hem-csoportot, s ez a kötődés felelős a fehérje aktivitásának megváltozásáért. Mi több, egy hasonló szekvenciamintázat fordul elő a különböző tioredoxinokban és protein diszulfid izomerázokban (Loferer és Hennecke, 1994), ezért nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy a konzerválódott ciszteinek redox-aktív központokként funkcionálnak, és a CycL fehérje más proteinekben levő ciszteinil oldalláncok oxidációs-redukciós reakcióit katalizálja.

5. MEGVITATÁS

A dolgozat a *Rhizobium meliloti* 41 egy olyan *fix* régiójának analízisét írja le, amelyben a bekövetkező mutációk nemcsak szimbiotikus körülmények között (Fix$^-$ fenotípus), hanem szabadon élve is (Rnr$^-$) a vad típusú baktériumétól eltérő fenotípust eredményeznek. Megállapítottuk, hogy mi a pleiotróp fenotípus oka, valamint meghatároztuk a régióban található géncsoport bázissorrendjét.

Az előzetes eredmények ismeretében megvizsgáltuk, hogy a régióban bekövetkező mutációk befolyásolják-e más oxido-redukciós reakciók, illetve a hozzájuk vezető elektron-transzport láncok működését. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a mutánsok citokróm *c* oxidáz aktivitásukat is elvesztették (Cox$^-$ fenotípus). A vad típusú és a mutáns baktériumok citokróm-tartalmának összehasonlításával kiderítettük, hogy az aerob körülmények között növesztett mutánsokból hiányzik mind az öt detektálható *c*-típusú citokróm. Ez arra utalt, hogy a régióban található gének nem az apocitokróm *c* fehérjéket kódolják, hanem valami olyan funkciót határoznak meg, ami minden *c*-típusú citokróm éréséhez szükséges.

5.1. A mutánsok pleiotróp fenotípusa

A fenti eredmények és a különböző elelktron-transzport láncokról rendelkezésre álló ismeretek birtokában a mutánsok pleiotróp fenotípusa, azaz a "respirációs" nitrát-redukció és a citokróm *c* oxidáz aktivitás hiánya *ex planta* , valamint az, hogy szimbiózisban képtelenek a légköri nitrogén redukciójára, az elektron-transzportban szerepet játszó *c*-típusú citokrómok távollétével megmagyarázható:

(i) Citokróm c *oxidáz:* A citokróm aa_3-típusú terminális oxidázokra jellemző, 603 nm-nél található csúcs erőteljes lecsökkenése illetve eltűnése a citokróm *c*-hiányos

baktériumok differrenciaspektrumából azt sugallja, hogy ez a mitokondriumokéhoz hasonló elektrontranszport-lánc koordináltan szerelődik össze elemeiből, azaz a különböző komponensek csak a többi jelenlétében képesek beépülni a citoplazma membránba, ott normális szerkezetüket kialakítani, és stabilan fennmaradni. Hasonló eredményre és következtetésre jutottak a *B. japonicum* citokróm aa_3-mal végződő légzési láncának vizsgálata során is. A respirációs rendszer ezen ágának bármelyik elemét kódoló génben (citokróm bc_1 *-fbcH* , citokróm *c -cycM* , citokróm aa_3 *-coxA*) hoztak létre mutációt, nemcsak az adott fehérje hiányzott, hanem a vele kapcsolatban álló többi protein sem (vagy csak nagyon kis mennyiségben) volt jelen a mutáns sejtekben (Thöny-Meyer és mtsai, 1989; Bott és mtsai, 1990; 1991). Ezt azzal magyarázták, hogy a feltételezett citokróm bc_1 -CycM-citokróm aa_3 szuperkomplex elemei egymás után, egymáshoz kapcsolódva épülnek be a membránba, és csak a többi jelenlétében maradnak fenn stabilan.

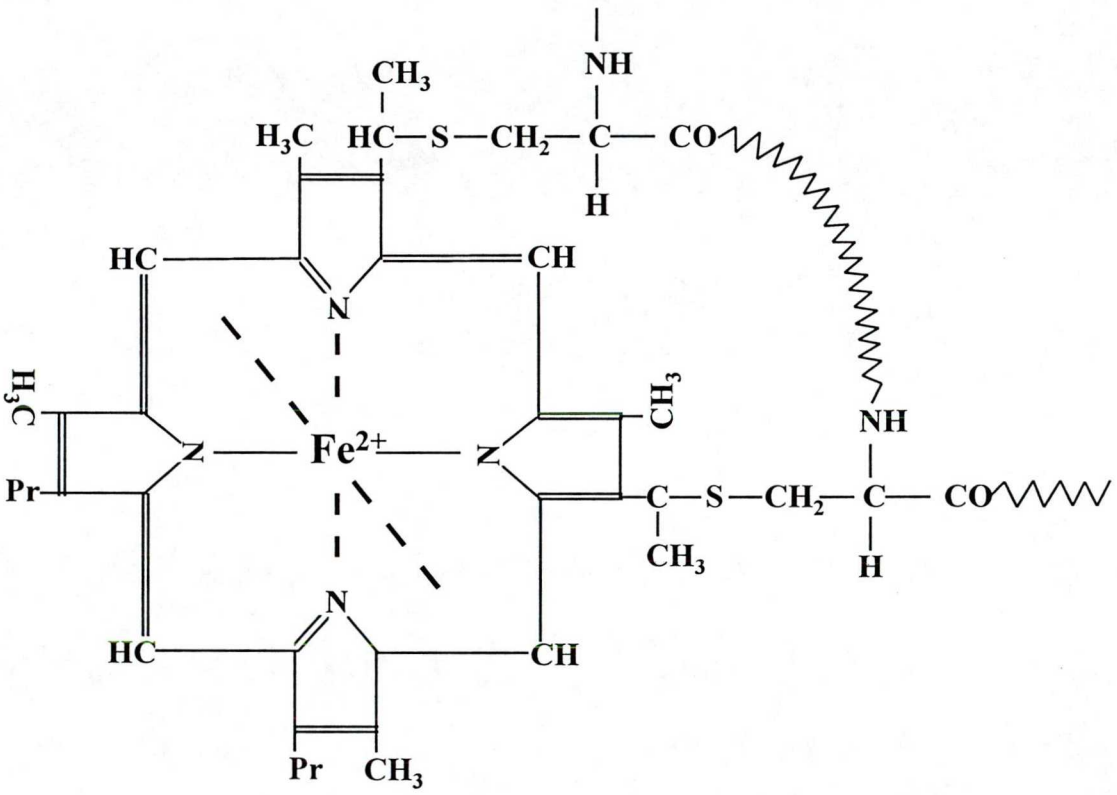
A citokróm *c*-hiányos *Rhizobium meliloti* sejtek aerob körülmények között normálisan növekedtek, ami azt jelenti, hogy működik bennük legalább egy olyan elektrontranszport-lánc, melynek terminális oxidáza az elektronokat nem a *c*-típusú citokrómokon keresztül, hanem közvetlenül a plazmamembrán kinol-raktárából kapja. Ennek (ezeknek) a ubikinol-oxidáz(ok)nak a természetéről még semmit sem tudunk.

(ii) Nitrát-reduktáz: A *c*-típusú citokrómok szerepét a *Bradyrhizobium japonicum* sejtek nitrát-légzésében már kimutatták (Ramseier és mtsai, 1991; Ritz és mtsai, 1993; 1995), azonban a nitrát-reduktáz enzimhez vezető elektrontranszport-lánc elemei közül eddig csak a citokróm bc_1 -et és c_{550} -et sikerült azonosítani (Thöny-Meyer és mtsai, 1989; Bott és mtsai, 1995). A *c*-típusú citokrómokkal nem rendelkező *Rhizobium meliloti* mutánsokban mind az úgynevezett "respirációs", mind az asszimilációs nitrát-reduktáz aktivitása erősen lecsökkent, illetve ki sem volt mutatható (Kondorosi és mtsai, 1973; Sík és Barabás, 1977; Kiss és mtsai, 1979), ami azt bizonyítja, hogy az elektronok ebben a fajban is *c*-típusú citokróm(ok) közvetítésével kerülnek a nitrát-reduktáz enzimre.

(iii) Szimbiotikus nitrogénkötés: A *Rhizobium melilotihoz* hasonlóan, a *Bradyrhizobium japonicum* és a *Rhizobium leguminosarum* fajok citokróm *c* bioszintézisben hibás mutánsai sem képesek a légköri nitrogén redukciójára (Ramseier és mtsai, 1991; Ritz és mtsai, 1993; 1995; Soberon és mtsai, 1993; Vargas és mtsai, 1994). Nemrégiben Preisig és mtsai (1993; 1996) kimutatták, hogy a szimbiotikus nitrogénkötés számára nélkülözhetetlen, mikroaerob körülmények között expresszálódó *fixNOQP* géncsoport egy új, nagy oxigén-affinitású, citokróm *c* fehérjéket tartalmazó, citokróm cbb_3-típusú terminális oxidázt kódol, mely specifikusan a légköri nitrogén redukcióját végző bakteroidok respirációjában játszik szerepet. Egy hasonló géncsoportot *Rhizobium melilotiból* is izoláltak (Batut és mtsai, 1989), azonban a régió teljes szekvenciáját még nem publikálták. A *fixP* cisztron által meghatározott, két protohem IX prosztetikus csoportot tartalmazó citokróm *c* fehérje aminosavsorrendje 49%-ban azonosnak bizonyult a két fajban. Eredményeink azt jelzik, hogy *Rhizobium melilotiban* szimbiotikus körülmények között olyan elektrontranszport-lánc működik, mely (a *fixNOQP* operon által is kódolt) *c* -típusú citokrómokat tartalmaz. Még nem tudjuk, hogy az aerob körülmények között növesztett *Rhizobium meliloti* sejtekből kimutatott *c* -típusú citokrómok közül szükséges-e valamelyik (pl. a még nem azonosított citokróm c_1), s ha igen, akkor melyik, a bakteroidok respirációjához. Mindazonáltal bizonyosnak vehető, hogy a mikroaerob körülmények között képződő *c*-típusú citokrómok (FixP, FixO) biogenezisében is szerepet játszanak a *fix-14* régióban található gének által kódolt fehérjék. Ezek alapján feltételezzük, hogy szimbiózisban a *Rhizobium meliloti* citokróm *c*-deficiens mutánsaiban nincs aktív, nagy oxigénaffinitással rendelkező terminális oxidáz, így a bakteroidok oxidatív foszforiláció révén nem képesek elegendő energiát termelni a rendkívül energiaigényes nitrogénredukció számára, és ezért Fix^- fenotípusúak.

5.2. A *c*-típusú citokrómok

A *c*-típusú citokrómok gyakorlatilag minden, az energia átalakításában szerepet játszó membránban jelen vannak és központi szerepet játszanak a respiráció, a denitrifikáció és a fotoszintézis elektrontranszfer folyamataiban. Ezek az elektrontranszport-proteinek vagy a baktériumok periplazmatikus terében helyezkednek el, vagy ha membránhoz kötöttek, akkor prosztetikus csoportot tartalmazó doménjük a periplazmatikus térbe nyúlik, azaz az elektrontranszfer a citoplazma-membrán külső felületén játszódik le (Pettigrew and Moore, 1987).



13. ábra. A c-típusú citokrómok prosztetikus csoportjának struktúrája.

A *c*-típusú citokrómokat az összes többi citokrómtól, illetve más hemoproteinektől az különbözteti meg, hogy prosztetikus csoportjuk (protohem IX) kovalensen kötődik az apoproteinhez. Eddig közel 200 *c*-típusú citokróm szekvenciáját határozták meg, és csaknem mindben találtak egy vagy több konzerválódott Cys-X-X-Cys-His hem-kötő

motívumot, melyben az X bármilyen aminosavat jelenthet. A protohem két vinil-oldallánca tioéter kötéssel kapcsolódik a két ciszteinil csoporthoz, a hisztidinil oldallánc pedig a hemben található vas ötödik, míg egy metionin a hatodik ligandjaként szolgál (13. ábra). E speciális tulajdonságokból következően az érett *c*-típusú citokrómok biogenezisének a következő lépéseket kell magába foglalnia: (i) Az apoprotein és a prosztetikus csoport szintézise a citoplazmában. (ii) E prekurzorok átszállítása a membránon. (iii) A szolubilis citokrómokról a szignálpeptid lehasítása. (iv) Az apoprotein és a prosztetikus csoport kovalens összekapcsolása, melyet feltehetőleg (egy) citokróm *c* hem liáz enzim(ek) katalizál(nak). (v) A holoenzim megfelelő konformációs formába hajtogatódása (folding).

Az első olyan géneket, melyek prokariótákban a *c*-típusú holocitokrómok kialakulásához szükségesek, csak az utóbbi években izolálták (Ramseier és mtsai, 1991; Beckman és mtsai, 1992; Ritz és mtsai, 1993; 1995; Vargas és mtsai, 1994; Page és Ferguson, 1995; Delgado és mtsai, 1995; Lang és mtsai, 1996). Mivel a holocitokróm *c* fehérjék bioszintézisének különböző lépéseit prokarióta rendszerekben biokémiai módszerekkel még nem sikerült demonstrálni, ezért a különböző géntermékek e folyamatokban betöltött szerepének tisztázása még várat magára.

5.3. A *fix-14* régióban kódolt proteinek lehetséges funkciója, a *c*-típusú citokrómok érésének modellje

Mivel prokarióta rendszerekben a citokróm *c* bioszintézis különböző lépéseit, valamint az ezekben szerepet játszó enzimeket biokémiai módszerekkel még nem sikerült azonosítani, így a CycH, CycJ, CycK, és CycL proteinek citokróm *c* biogenezisben betöltött szerepére vonatkozóan csak találgatásokba bocsájtkozhatunk. A *c*-típusú citokrómok éréséről rendelkezésre álló eddigi biokémiai, és jóval számosabb genetikai adat alapján kialakult képbe (Thöny-Meyer és mtsai, 1994) megpróbáljuk beilleszteni a saját eredményeinket.

A *fix-14* régió mutánsainak vizsgálata kiderítette, hogy a mutánsokból egységesen hiányzik az összes detektálható *c*-típusú citokróm. Ez azt jelenti, hogy a régió génjei nem az apocitokrómokat kódolják, hanem olyan fehérjéket, melyek a *c*-típusú citokrómok érési folyamatában vesznek részt. A DNS-régió felépítése (átfedő transzlációs terminációs és iniciációs kodonok, s az analógia más operonokkal) arra utal, hogy a régióban kódolt proteinek nemcsak együtt termelődnek, hanem funkciójuk is kapcsolt lehet. A fehérjék számítógépes analízise illetve topológiai vizsgálata azt mutatta, hogy vagy a periplazmatikus térbe transzportálódnak, vagy ha membránproteinek (például CycK), akkor a leginkább konzerválódott szakaszuk a periplazmatikus részen helyezkedik el, azaz valamilyen a membránban, illetve annak külső felületén lejátszódó folyamatban játszanak szerepet. Mielőtt feltételezéseinket elmondanánk, hogy ez a *c* -típusú citokrómok biogenezisének melyik lépése lehet, tekintsük át azokat az ismereteket, melyek az érési folyamatról a rendelkezésünkre állnak (14. ábra)!

(1) A jelenlegi elképzelések szerint, a citoplazmában vagy a citoplazma-membrán belső felületén szintetizálódott pre-apocitokróm *c* és hem

(2) transzlokálódik a membránon keresztül. Page és Ferguson (1989; 1990) eredményei szerint ez a transzlokáció megelőzi kovalens összekapcsolódásukat, ugyanis érett c-típusú citokrómokat nem tartalmazó mutáns *Paracoccus denitrificans* sejtek periplazmájából ki lehetett mutatni a citokróm c_{550} és cd_1 apo formáit. A pre-apoprotein, mely szekréciós szignálpeptidet tartalmaz, az általános szekréciós rendszeren transzportálódik (Daldal és mtsai, 1986; Wieseler és mtsai, 1992). A hem valószínűleg egy ABC-transzporteren keresztül kerül ki, melyet *B. japonicum*ban és *R. capsulatus*ban a *cycVWXZ* illetve a *helABCD* gének kódolhatnak (Ramseier és mtsai, 1991; Beckman és mtsai, 1992). Ennek a transzporternek az egyik alegysége lehet a korábban említett feltételezett hem-kötő fehérje (CycZ/HelC).

(3) A *tlpB/helX* gén terméke (Ramseier és mtsai, 1991; Beckman és Kranz, 1993), mely egy periplazmatikus tioredoxin-szerű fehérje, valószínűleg fenntartja a pre-apocitokróm *c*

fehérje hemkötő csoportjaiban (CXXCH) a ciszteinil láncok redukált állapotát. A hem is redukálódik vagy redukált állapotban marad, s a citokróm *c* hem liáz enzimre kerül.

(4) A citokróm *c* hem liáz összekapcsolja a hemet és az apocitokróm *c* fehérjét.

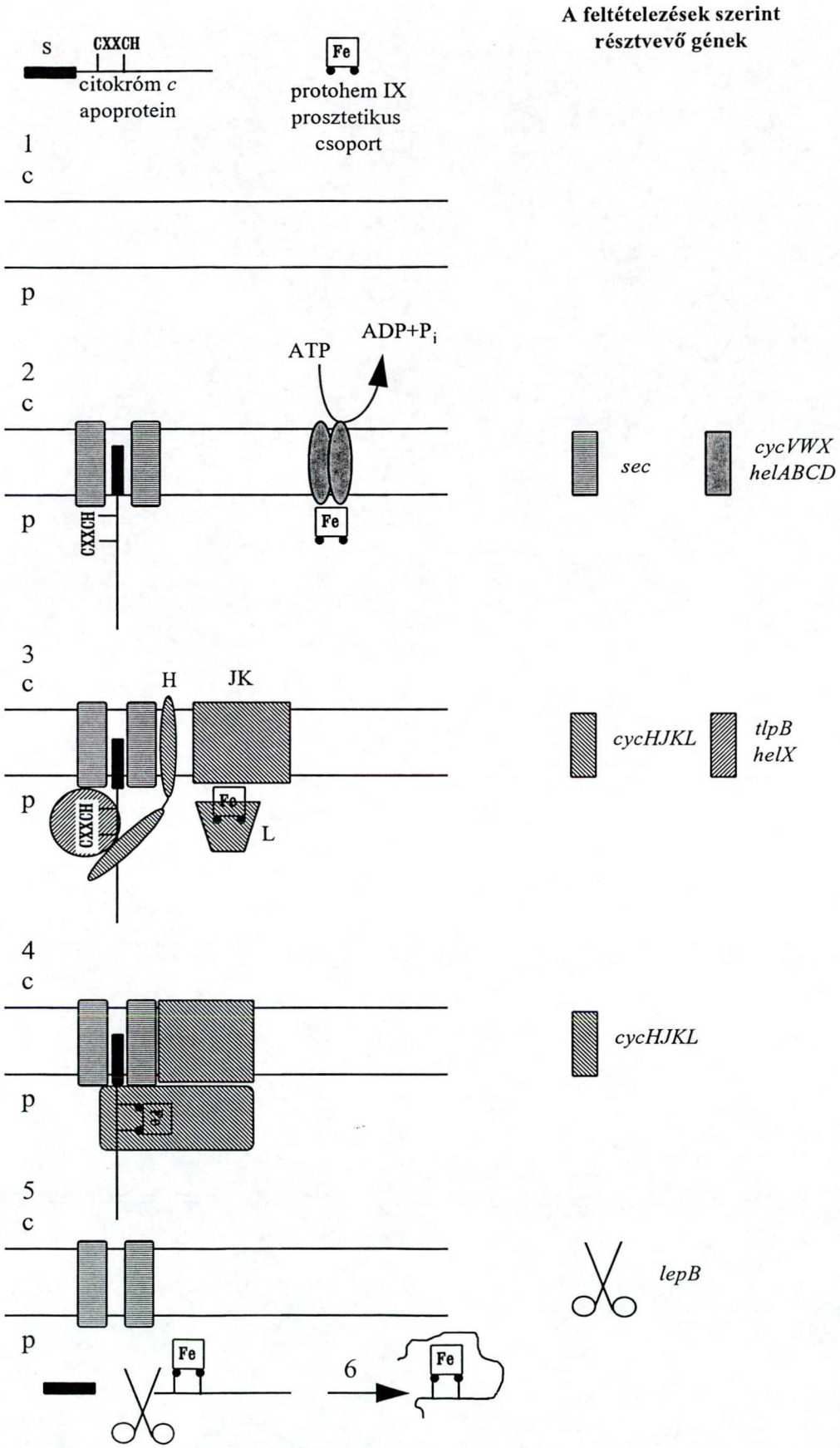
(5) A szignálpeptidáz lehasítja a szolubilis citokrómokról a szignálpeptidet, melyek így kiszabadulnak a membránból. Ez a lépés vagy a hem kovalens kapcsolódása után, vagy attól függetlenül játszódik le. Ezen elképzelés mellett két érv szól: egyrészt *B. japonicumban* a hem kötődött olyan mutáns citokróm bc_1 prekurzorhoz, melyben a szignálpeptid nem hasítódott le, s ennélfogva a komplex nem is alakult ki (Thöny-Meyer és mtsai, 1991), másrészt léteznek olyan *c*-típusú holocitokrómok (például a CycM *B. japonicumban*), melyek amino-terminális részén a szekréciós szignálpeptidekhez hasonló szekvencia van, de az nem hasítódik le, hanem a hidrofób rész a fehérje membránhoz horgonyzásában vesz részt (Bott és mtsai, 1991).

(6) A holocitokróm *c* a megfelelő konformációba hajtogatódik, asszociálódik más elektrontranszport proteinekkel, melyek az adott funkció ellátására komplexbe tömörülnek, s így a funkció ellátására stabilizálódik. A proteinek stabilitásához, valamint a funkcióképes komplexek kialakulásához az ép hem-kötő hely, valamint a normális térszerkezetű protein szükséges (Thöny-Meyer és mtsai, 1991).

---

14. ábra. (következő lap) A bakteriális (szolubilis) *c*-típusú citokrómok érési folyamatának modellje Thöny-Meyer és mtsai alapján. A bal oldalon található számok megfelelnek a szövegben az egyes lépéseket jelző számoknak. A 4. lépés a citokróm c_1 kivételével az összes membránba ágyazódó *c*-típusú citokróm éréséből hiányzik. c: a membrán citoplazmatikus, p: periplazmatikus oldala. s:szignál-peptid, CXXCH: *c*-típusú citokrómokban a hem kötődési helye. A *sec* géncsoport az általános szekréciós rendszer elemeit, a *lepB* gén a szignál-peptidázt kódolja.

SZEGED


A feltételezések szerint résztvevő gének
S
CXXCH
citokróm *c* apoprotein
Fe
protohem IX prosztetikus csoport
1
c
p
2
c
ATP
ADP+P$_i$
p
CXXCH
Fe
sec
cycVWX
helABCD
3
c
H
JK
p
CXXCH
Fe
L
cycHJKL
tlpB
helX
4
c
p
Fe
cycHJKL
5
c
p
Fe
6
Fe
lepB

A fenti lépések melyikében vehetnek részt a *fix-14* régióban kódolt proteinek? E fehérjék közül kettő, a CycK és CycL olyan szekvenciamotívumot tartalmaz, melynek hem-kötő szerepe lehet. A *c*-típusú citokrómok biogenezisében a periplazmatikus illetve a periplazmába irányuló hem-kötő proteinek funkciója többféle lehet: a hem és az apoprotein kovalens összekapcsolása, azaz a citokróm *c* hem liáz aktivitás; a hemben levő vas redukálása Fe2+-vé; annak megakadályozása, hogy az ABC-transzporteren keresztül transzportálódott hem a citoplazma-membrán hidrofób környezetében vagy a periplazmatikus tér folyadékában szabaddá váljon; a megkötött hem odajuttatása a citokróm *c* hem liáz enzimhez. Bár nem mutatnak szignifikáns homológiát a mitokondriális citokróm *c* hem liázokhoz, attraktív lehetőségnek tűnik, hogy a *cycHJKL* gének a baktériumok több alegységből felépülő citokróm *c* hem liázát határozzák meg. E komplexben a CycK fehérje, melyhez hasonló proteineket az eukarióták organelláris genomjai is kódolnak, játszhat szerepet a transzportálódott hem megkötésében, esetleges redukciójában, és a liáz enzimhez való juttatásában, míg a CycL a hem valamint az apoprotein összekapcsolódását katalizálhatja. A másik két protein (CycH, CycJ) e feladatok bármelyikében, vagy a komplex megfelelő struktúrájának kialakításában vehet részt.

5.4. A TÉMA JÖVŐJE

A prokarióták *c*-típusú citokrómjainak érését leíró modellek (Thöny-Meyer és mtsai, 1994), köztük az általunk ismertetett is, figyelembe veszik a rendelkezésre álló különböző mutánsok fenotípusát, a hozzáférhető szekvencia-információkat, valamint a várt illetve prediktált biokémiai funkciókat, azonban még a folyamat egyetlen lépésére sem (kivéve az apocitokróm *c* transzportját, a szignálpeptid lehasítását) rendelkeznek kísérletes bizonyítékkal. Éppen ezért, a jövő nagy kihívása, hogy rendelkezésre álló egyre nagyobb számú mutáns segítségével, a folyamatban résztvevő komponensek tisztításával, valamint a

különböző egyedi lépésekre kidolgozandó biokémiai vizsgálati módszerekkel felderítsük a folyamat teljes egészét, s igazoljuk elképzeléseink helyességét.

A további kutatások egy másik iránya a gyakorlati alkalmazhatóság irányába vezethet. Előzetes komplementációs kísérletekben ugyanis azt tapasztaltuk, hogy bizonyos törzsek, melyek egyes kromoszómán levő mutációk és a kis kópiaszámú komplementáló plazmidon bejuttatott Tn5 inszerciók bizonyos konstellációit hordozzák, hatékonyabb nitrogénkötésre voltak képesek, mint a vad típusú baktériumok (kb. 25%-kal magasabb szárazsúly). Ennek oka valószínűleg a *c*-típusú citokrómok magassab szintű expressziója. A jelenség megértéséhez, illetve a feltételezésünk helyességének ellenőrzéséhez szükséges, hogy:

-szekvenált és jól jellemzett mutációk segítségével megállapítsuk, mely *cyc* gének ben bekövetkező mutációk vezetnek a fenti jelenséghez,

-összehasonlítsuk a vad típusú és a "szupereffektív" törzsekben a *c*-típusú citokrómok mennyiségét,

-megvizsgáljuk szimbiotikus körülmények között a *cycHJKL* gének regulációját,

-megállapítsuk, hogy vajon a szimbiózis specifikus gének (pl. *nifH*, *fixNOPQ*) expressziója megnövekedett-e a "szupereffektív" törzsekben.

A későbbiekben a mezőgazdasági hasznosításra is alkalmas törzs (antibiotikum-rezisztens helyett például nehézfém-ion rezisztens) előállítására is sor kerülhet.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat a lucerna szimbiotikus partnere, a *Rhizobium meliloti* egy géncsoportjának szerkezeti és funkcionális analízisét tárgyalja. A géncsoport *ex planta* a "respirációs" nitrát-redukcióhoz, míg szimbiózisban a légköri nitrogén fixálásához szükséges. Kísérleteink során a következő eredményekre jutottunk:

-Megállapítottuk, hogy a *fix-14* régió mutánsai nemcsak a nitrát és a légköri nitrogén redukciójára képtelenek, hanem bennük a légzési lánc egyes elemei, így a citokróm *c* oxidázok sem funkcionálnak

-Spektroszkópiai és biokémiai módszerekkel kiderítettük, hogy a *fix-14* régióban kódolt fehérjék a sejt összes *c*-típusú citokrómjának bioszintézisében játszanak esszenciális szerepet. A mutációk pleiotróp hatásának oka, hogy ezek az elektrontranszport-proteinek hiányoznak a mutánsokból.

-M13 és pUC19 vektorokba épített átfedő DNS-fragmentek szekvencia analízise segítségével meghatároztuk a *fix-14* régió nukleotid-sorrendjét.

-Számítógépes analízissel négy, egyirányban átíródó nyitott leolvasási keret (ORF) valószínűsíthető, melyek feltehetőleg egy transzkripciós egységet alkotnak. Az ORF-eket *cycH*, *cycJ*, *cycK*, és *cycL* géneknek neveztük el.

-Számítógépes módszerek alkalmazásával arra a következtetésre jutottunk, hogy a génekről átírható feltételezett fehérjetermékek vagy a citoplazma-membrán integráns részei, vagy annak periplazmatikus oldalára transzportálódnak.

-Kimutattuk, hogy a négy gén által kódolt fehérjék olyan bakteriális illetve eukarióta organellum eredetű fehérjékhez hasonlítanak, melyek szintén a *c*-típusú citokrómok érésében vesznek részt.

-A prokarióták *c*-típusú citokrómjainak biogeneziséről rendelkezésünkre álló genetikai és kisebb számú biokémiai adatok alapján azt feltételezzük, hogy a *cycHJKL* gének által kódolt fehérjék egy olyan komplexet alkotnak, amely a protohem IX és a citokróm *c* apoproteinek kovalens összekapcsolását katalizálják.

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

SUMMARY

Introduction

Soil bacteria belonging to the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* induce the formation of nodules on the roots of leguminous plants and reduce atmospheric nitrogen in this symbiotic association. While the low oxygen concentration (3-30 nM) within the infected nodule tissue (Layzell et al. 1990; Witty and Minchin, 1990) is necessary for the optimal functioning of the oxygen sensitive nitrogenase, endosymbiotic bacteria have to gain energy via respiration for the energetically expensive nitrogen fixation. It has been a long-standing hypothesis that rhizobial bacteroids possess a symbiosis-specific electron transport chain terminated by an oxidase with a high affinity for O_2 (Appleby, 1984). Recently, Preisig et al. (1993, 1996) presented evidence that the symbiotically essential, microaerobically induced *fixNOQP* gene cluster of *Bradyrhizobium japonicum* encodes *c*-type cytochromes and a membrane-bound cytochrome *c* oxidase of the novel *cbb3* type which might function in the bacteroids.

The *c*-type cytochromes have covalently attached hem prosthetic groups that are linked *via* thio-ether bonds usually to two cysteinyl residues of the apoprotein (Pettigrew and Moore, 1987). All bacterial *c*-type cytochromes are located in the periplasm or face the periplasmic side when inserted in the cytoplasmic membrane. The biogenesis of the *c*-type cytochromes consists of the following steps: i) synthesis and ii) membrane-transport of the apoprotein and of the prosthetic group (protohem IX), iii) covalent attachment of the hem to the apoprotein by cytochrome *c* hem lyase, iv) and folding into the mature holocytochrome *c* (for a review see Thöny-Meyer et al. 1994).

In prokaryotes, genes required for the formation of mature *c* -type cytochromes have been described only recently (reviewed by Thöny-Meyer et al. 1994). Since the various biochemical functions specific for cytochrome *c* biosynthesis have not been showed in any prokaryotic system yet, the roles of the different gene products remain to be elucidated. *B. japonicum* mutants lacking *c*-type cytochromes have highly pleiotropic phenotypes: they are symbiotically ineffective (Fix$^-$), unable to grow anaerobically with nitrate as the terminal electron acceptor, and have no cytochrome *c* oxidase activity (Ramseier et al. 1991; Ritz et al. 1993, 1995).

In *R. meliloti* , the symbiotic partner of alfalfa (*Medicago sativa*) the components of the different electron transport chains as well as the types of cytochromes involved in symbiotic functions have not been investigated yet. In contrast to *B. japonicum*, *R. meliloti* is not able to fix nitrogen *ex planta* and cannot use nitrate as terminal electron acceptor under oxigen-limiting conditions, however, high nitrate reductase activity was demonstrated at the end of the exponential growth, referred to as "respiratory" nitrate reductase activity (Kondorosi et al. 1973; Sik and Barabas 1977; Kiss et al. 1979). Early studies showed that *R. meliloti* mutants defective in "respiratory" nitrate reduction (Rnr$^-$) induced and invaded nodules on the roots of alfalfa but they were unable to reduce atmospheric nitrogen (Fix$^-$) (Kondorosi et al. 1973). The pleiotropic effect of the mutations was explained by a defect either in the mobilisation and insertion of the molybdenum into the molybdenum cofactor(s) of nitrate reductase and nitrogenase or in (a) common element(s) of the electron transport chains channeling electrons to the enzymes. Further studies revealed that the mutants exhibited 30 to 100 times less methyl-viologen coupled nitrate reductase activity than the wild type cells and this activity proved to be sufficient to support growth in media containing nitrate as sole nitrogen source (Sik and Barabas 1977; Kiss et al. 1979). Moreover, they were shown to posses an active molybdenum cofactor for nitrate reductase, indicating that the biosynthesis of molybdenum-containing cofactors was not impaired.

To isolate the wild type region affecting both "respiratory" nitrate reduction (Rnr) and symbiotic nitrogen fixation (Fix), a *R. meliloti* genomic library was introduced into the mutant N461, one of the Rnr$^-$ Fix$^-$ point mutants isolated earlier (Kondorosi et al. 1973). From 1500 transconjugants tested, three clones proved to be Rnr$^+$ Fix$^+$. All the three harboured the same cosmid clone which was designated pKSK1. The chromosomal position of the mutation was determined by the method of Forrai et al (1983). When the *ade-1*, *cys-46* marker pair was complemented more than 90% of the prototrophs showed Rnr$^-$ Fix$^-$ phenotypes, indicating that the locus is linked to (probably located between) these markers. In earlier studies (Forrai et al. 1983), it was demonstrated that the *fix-14* mutation (in strain ZB313) obtained after random Tn5 mutagenesis is situated on the same segment of the chromosome. By complementation studies, it was demonstrated that the two loci mutated in strains N461 and ZB313 are identical, henceforth we refer to this region as the *fix-14* region.

To delimit the genes in the *fix-14* region, directed Tn5 mutagenesis was carried out on the complementing cosmid clone. The mutations were introduced into the wild type genome by homologous recombination then the homogenotes were tested for "respiratory" nitrate reductase activity and for nitrogen fixation ability in alfalfa root nodules. The Tn5 insertions on a 4.5 kb segment of the chromosome resulted in both Rnr$^-$ and Fix$^-$ phenotypes.

Results and discussion

Mutations in the *fix-14* region affect cytochrome *c* biogenesis

We tested whether other electron transport chains were affected by the mutations localized in the *fix-14* region. None of the Tn5-induced mutants exhibiting an Rnr$^-$ phenotype *ex*

planta and a Fix$^-$ phenotype in symbiosis was able to oxidize N,N,N',N',-tetramethyl-para-phenilenediamine (TMPD), indicating that these strains lack cytochrome *c* oxidase activity, i.e. they are Cox$^-$.

A Cox$^-$ phenotype can be the result of a defect in the cytochrome *c* oxidase or/and in the electron transport chain carrying the electrons to this terminal oxidase (Bott et al. 1990). Therefore the mutants were assayed by *in vivo* difference spectroscopy (Appleby, 1969) for any changes in their cytochrome content. Comparison of the spectra of the wild type and mutant bacteria revealed that the characteristic peak at 523 nm and the shoulder at 552 nm originated from the *c*-type cytochromes were misssing in the spectra of the Rnr$^-$ Fix$^-$ mutants, although the *b*-type cytochromes were retained (shoulder at 530 nm and peak at 560 nm). The cytochrome *aa3* (peak at 603 nm) content of the mutant cells was also found to be highly reduced.

To analyse the cellular distribution of the *c*-type cytochromes in more detail, membrane and soluble fractions of aerobically grown wild type and mutant cells were prepared, the proteins were separated in SDS-PAGE and stained for covalently-bound hem. In the membrane fraction of the wild type cells, two *c*-type cytochromes with the apparent molecular mass of 42 and 32 kDa, respectively, were detected. In the soluble fraction, the presence of three *c*-type cytochromes with the apparent molecular mass of 48 , 35 , and 13 kDa, respectively, were shown. All the membrane-bound and soluble *c*-type cytochromes were absent from mutants 56, 52, 87, and 314 suggesting that mutations affected genes which are involved in cytochrome *c* biogenesis rather than genes for cytochrome *c* apoproteins. Thus, the highly pleiotropic effect of the mutations, i.e. the lack of "respiratory" nitrate reductase and cytochrome *c* oxidase enzyme activities, as well as symbiotic nitrogen fixation ability, can be interpreted as the consequence of the absence of c-type cytochromes.

Cytochrome *c*-deficient mutants were able to grow aerobically indicating the presence of (a) cytochrome *c* independent terminal oxidase(s) (ubiquinol oxidase) that received

electrons directly from the ubiquinol pool. The disappearance of the peak at 603 nm characteristic for the cytochrome c oxidase (cytochrome *aa3*) of mitochondrial type from the spectra of the cytochrome *c* deficient mutants suggests that the elements of this electron transport chain are coordinately assembled. Similarly, *B. japonicum* cells carrying a mutation in the *cycM* gene encoding a 20 kDa membrane-bound cytochrome *c* did not retain cytochrome *aa3* which was explained by a failure in the assembly of the proposed cytochrome *bc1*-CycM-cytochrome *aa3* complex (Bott et al. 1990; 1991).

C-type cytochromes have already been shown to be required for nitrate respiration in *B. japonicum*, however, the electron transport chain leading to nitrate reductase remains to be elucidated (Ramseier et al. 1991; Ritz et al. 1993). In cytochrome c-deficient mutants of *R. meliloti* both "respiratory" and assimilatory nitrate reductase activities were highly reduced indicating that the electrons required for the redution of nitrate were carried by *c*-type cytochromes.

Cytochrome *c* deficient mutants of *B. japonicum* and *R. phaseoli* were reported to be Fix^- (Ramseier et al. 1991; Ritz et al. 1993; Soberon et al. 1993). Recently, Preisig et al. (1993) showed that in *B. japonicum* the symbiotically essential, microaerobically induced *fixNOQP* gene cluster encoded a *cbb3*-type cytochrome *c* oxidase wich was specifically required to support bacterial respiration during symbiosis. A similar gene cluster was isolated from *R.meliloti* (Batut et al. 1989), however the sequence of the region has not been published yet. The FixP protein of *B.japonicum* predicted to be a dihem *c*-type cytochrome by sequence analysis shared 49% amino acid identity with its unpublished *R. meliloti* counterpart (Preisig et al. 1993). Our results indicate that a cytochrome *c* containing electron transport chain functions under symbiotic conditions also in *R.meliloti* . It is not known whether any of the cytochromes detected in the aerobically grown cells are necessary for bacteroid respiration or all the required electron transport proteins are produced only under microaerobic conditions. Nevertheless, the biogenesis of the c-type cytochromes formed in symbiosis also requires the activity of the proteins encoded by the

genes described in this dissertation. We suppose that in the cytochrome *c* deficient *R. meliloti* mutants there is no active terminal oxidase with high affinity for O_2 and the bacteroids are unable to gain energy *via* oxidative phosphorylation for the energetically expensive nitrogen reduction, resulting in their Fix$^-$ phenotype.

The *fix-14* region contains four genes, *cycH, J, K* and *L*

In order to identify the genes and the gene products required for the formation of *c*-type cytochromes in *R. meliloti*, the nucleotide sequence of the *fix-14* region delimited by Tn5 mutagenesis was determined. For this purpose appropriate overlapping restriction fragments of the cosmid clones pPP381 and pKSKI as well as the Tn5-flanking regions from a number of insertion mutants were subcloned. Using M13 universal and reverse primers as well as a Tn5-specific oligonucleotide the entire region consisting of 4781 basepairs was sequenced on both strands.

Computer-aided analysis of the sequence data revealed four Open Reading Frames (ORFs) with codon usage typical for *R. meliloti* which were transcribed into the same direction. No promoter sequence preceded, and no typical transcription terminator followed the four ORFs. The first ORF started at position 463 between the two Tn5 insertions (Tn5(66) and Tn5(56) at positions 405 and 645, respectively) that resulted in different phenotypes. ORF1 encoded a putative protein of 379 amino acids (Mw 40,072). The putative protein product of the ORF2 consisted of 150 amino acids (Mw 15,789). The third ORF was 2028 bp long and encoded a protein of 676 amino acids (Mw 72,643). The fourth ORF had two possible ATG initiation codons at positions 4085 and 4139. Although the second ATG followed the stop codon of the third ORF by 64 bp, a potential ribosome binding site was found 7bp 5' to the initiation codon which would allow ribosomal reinitiation to produce the shorter protein. Analysis of the gene product suggested that ORF4 encoded the shorter protein (Mw 16,454). According to the nomenclature of genes

involved in the formation of *c*-type cytochromes in rhizobia, these genes were designated as *cycH*, *J*, *K*, and *L*. The ATG initiation codons of the second and the third ORFs overlapped with the TGA termination codons of the upstream ORFs. The ATGA sequence was shown to serve as translational termination and initiation codons for the *R. meliloti nodAB* genes that are coupled both functionally and transcriptionally (Török et al. 1984, Röhrig et al. 1994). Similarly, the existence of the overlapping transcriptional termination and initiation codons in the fix-14 region suggests translational and probably functional coupling of the genes.

The *cycH*, *J*, *K*, and *L* genes encode putative membrane-anchored proteins

The predicted amino acid sequences of the four ORFs were investigated by computer-assisted methods for recognizable sequence motifs. The hydrophobicity plot (Eisenberg et al. 1984; Rao and Argos, 1986) of CycH showed two hydrophobic domains between amino acids at positions 3 and 22, as well as 95 and 115, respectively, that were sufficient in size to span the inner membrane and to act as a membrane anchor for the protein. Analysis of the predicted amino acid sequence of CycJ indicated a hydrophobic region between amino acids at positions 9-29. The hydrophobic stretch was preceded by basic amino acids (RKXKR) and followed by a potential secretory signal cleavage site between positions 32 and 33, suggesting that the protein might be directed to the periplasmic space (von Heijne 1986). The predicted product of *cycK* was a hydrophobic protein with at least 12 membrane spanning domains indicating that it might be an integral membrane protein (Fig. 10). The basic amino-terminus of the CycL protein was followed by a hydrophobic region and a possible signal peptide cleavage site at Ala-20 (von Heijne 1986), suggesting its probable periplasmic location. Its hydrophobic C-terminus might anchor the protein to the outer side of the cytoplasmic membrane.

The proteins encoded in the *cycHJKL* cluster are similar to bacterial and organellar proteins involved in cytochrome *c* formation

Comparison of the predicted amino acid sequences of the *cycH*, *J*, *K*, and *L* genes with protein (SWISS-PROT Release 29.0, PIR Release 41.0) and pretranslated nucleic acid (GenBank Release 84.0) databases revealed significant similarities mostly to bacterial proteins. We could not find, however, any related proteins with known biochemical functions. Beside the bradyrhizobial counterparts, the Ccl1 and Ccl2 proteins of the phylogenetically related *Rhodobacter capsulatus*, reported to be involved in cytochrome c biogenesis (Beckman et al. 1992), showed the highest degree of similarity to the CycK (53.5%) and CycL (53.7%) proteins, respectively.

In *E.coli* two gene clusters were found which encoded proteins similar to the *cycH*, *J*, *K* and *L* gene products. The *nrf* gene cluster coded for seven proteins necessary for the activity of the tetrahem cytochrome *c552* (*nrfA* gene product) nitrite reductase of the formate-dependent nitrite reduction pathway (Darwin et al. 1993; Hussain et al. 1994). The CycH, CycK, and CycL proteins had 21.4%, 43.8%, and 36.9% identical residues with the *nrfG*, *nrfE*, and *nrfF* gene products, respectively.

The other gene cluster located in the *centisome* 49 region of *E. coli* K-12 (GenBank Release 84.0, accession number U00008, submitted by Robison, K.), the *ccm* operon encoded proteins exhibiting similarity not only to the CycH, CycJ, CycK, and CycL proteins but also to different subunits of nitrite and nitrate reductases (for example, a tetrahem *c*-type cytochrome), as well as to the protein products of the *cycVWX*, *tlpB* genes of *B. japonicum* (Ramseier et al.1991) necessary for the formation of *c*-type cytochromes. The CycJ and CycK proteins shared 41% and 44.5% amino acid identity with the putative CcmE and CcmF proteins, respectively. CycJ was predicted to have a secretory signal peptide, however, the hydrophobic amino-terminus of the CcmE protein did not contain a signal-like sequence. This difference can be explained by the possibility that signal

peptidase does not cleave the amino-terminal part of the rhizobial protein and the protein remains anchored to the cytoplasmic membrane via a hydrophobic stretch of amino acids. The amino-terminus of the CcmH protein showed 33.3% similarity to CycL, while its carboxy-terminal part had 23.3% identical residues with the CycH protein over 190 amino acids. It would be interesting to see whether the function(s) encoded by two individual genes in *R. meliloti* is (are) provided by one protein in *E. coli*.

The organellar genomes of several higher eukaryotes were shown to encode CycK-like proteins (Ohyama et al. 1986; Oda et al. 1992; Schuster et al. 1993), although a similar protein has not been identified in yeast, the best-known organism regarding cytochrome *c* formation (Gonzales and Neupert, 1990). The mitochondrial and chloroplast proteins showed the highest degree of similarity (49% identity over 145 amino acids, and 25% identity over 130 amino acids, respectively) around a stretch (WGGF/WWFD) rich in amino acids carrying aromatic side chains which was extremely conserved in the CycK-related proteins. This conserved domain is thought to be a hem-binding site (Beckman et al. 1992). This proposed hem-binding activity of the proteins might be necessary to prevent the release of the translocated hem into solution or into the hydrophobic environment of the membrane, and/or to present the hem so that the cytochrome *c* hem lyase and/or the apocytochrome might get into close contact with the hem. The most conserved part of the CycJ protein (LRCXXCQ) is also a proposed hem binding site (Beckman et al. 1992) which is similar to the site implicated in the covalent attachment of hem in the *c*-type cytochromes and to an amino acid stretch present in mitochondrial cytochrome *c* hem lyases (Dumont et al. 1987; Nicholson et al. 1989) as well as to the putative hem-responsive elements in the hem activator regulatory protein of yeast (Creusot et al. 1988; Pfeifer et al. 1989). In addition, a similar sequence motif was found in thioredoxins and protein disulphide isomerases (reviewed by Loferer and Hennecke 1994). We therefore cannot exclude the possibility that cysteines serve as redox active centres and CycL catalyzes the redox reactions of the cysteinyl groups in other proteins.

The possible role of the proteins encoded in the *fix-14* region

Since in prokaryotic systems the various enzymes participating in cytochrome *c* biogenesis have not been identified yet, despite of the striking similarities presented here, we can only hypothetize the role of the *cycHJKL*-encoded proteins in the formation of all *c*-type cytochromes. The fact that the proteins encoded by the *cycHJKL* genes may be transported through or anchored to the cytoplasmic membrane suggests that these proteins may play a role during cytochrome *c* biogenesis in a step taking place either in the cytoplasmic membrane or at its periplasmic side. The apoprotein is transported through the general secretory system (Daldal et al. 1986; Wieseler et al. 1992) while the hem is thought to be transported via an ABC-transporter encoded by the *cycVWX* genes of *B. japonicum* and the *helABC* genes of *R. capsulatus* (Ramseier et al. 1991; Beckman et al. 1992). Therefore we propose that the four proteins encoded by the *cycHJKL* genes form a complex catalyzing the covalent attachment of protohem IX to the cytochrome *c* apoprotein.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

PUTNOKY, P., PETROVICS, G., **KERESZT, A.,** GROSSKOPF, E., HA, D.T.C., BANFALVI, Z., KONDOROSI, A. (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 172:5450-5458

KERESZT, A., SLASKA-KISS, K., PUTNOKY, P., BANFALVI, Z., KONDOROSI, A. The *cycHJKL* genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome *c* biogenesis are required for "respiratory" nitrate reduction ex planta and for nitrogen fixation during symbiosis. Mol. Gen. Genet. 247:39-47, 1995.

KISS, E., REUHS, B.L., KIM, J.S., **KERESZT, A.,** PETROVICS, G., PUTNOKY, P., DUSHA, I., CARLSON, R.W., and. KONDOROSI, A. (1997). The *rkpGHI* and *J* genes are involved in capsular polysaccharide production of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol.(nyomdában).

PUTNOKY P., ENDRE G., GROSSKOPF E., **KERESZT A.,** KONDOROSI , A. (1993) *Fix-2* region of *Rhizobium meliloti* is involved in pH regulation. In: Palacios, R., Mora, J., Newton, W.E. eds. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, p.490.

KERESZT A, SLASKA-KISS K, PUTNOKY P, BANFALVI Z, KONDOROSI Á. The *fix-14* region of *Rhizobium meliloti* is involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes. In: Kiss GB, Endre G, eds. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on the "Safe application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". Officina Press, Szeged, p.297, 1994.

KISS E., PERTROVICS G., PUTNOKY P., **KERESZT A.,** DUSHA I., KONDOROSI A. The *fix-23* genes of *Rhizobium meliloti* are involved in the production of a capsular polysaccharide which play a role in nodule development. In: Kiss GB, Endre G, eds. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on the "Safe application of Genetically Modified Microorganisms in the Environment". Officina Press, Szeged, p.317., 1994.

PUTNOKY, P., **KERESZT, A.,** ENDRE, G., GROSSKOPF, E., KISS, P., KONDOROSI, A. *pha*: a *fix* region of *Rhizobium meliloti* is required for pH adaptation and encodes for proteins homologous to subunits of different proton-translocating systems. (beküldve)

KISS, G.B. KALÓ, P., CSANÁDI, G., FELFÖLDI, K., KISS, P., **KERESZT, A.,** and ENDRE, G. 1997. Colourmapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping (beküldve).

KALÓ, P., CSANÁDI, G., ENDRE, G., FELFÖLDI, K., **KERESZT, A.,** KISS, P. and KISS, G.B. 1997. Construction of an improved genetic map of diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using a novel linkage analysis for chromosomal regions exhibiting extreme distorted segregations (beküldve).

KISS, E., **KERESZT, A.,** OLAH, B., DOWNIE, J.A., KONDOROSI, A., KONDOROSI, E. Negative regulation of the nodulation genes by NolR in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* TOM. (kézirat elkészítése folyamatban).

9. IRODALOMJEGYZÉK

Allen, O.N. and Allen, E.K. (1981) The Leguminosae. The University of Wisconsin Press, Madison.

Appleby, C.A. (1969) Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. Biochim Biophys Acta 172:88-105.

Appleby, C.A. (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Annu Rev Plant Physiol 35:443-478.

Appleby, C.A., and Bergersen, F.J. (1958) Cytochromes of *Rhizobium*. Nature (London) 182:1174.

Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains. Annu Rev Biochem 57:101-132.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local aligment tool. J Mol Biol 215:403-410.

Basset, B., Goodman, R.N., and Novacky, A. (1977) Ultrastructure of soybean nodules: Release of rhizobia from the infection thread. Can. J. Microbiol. 573-582.

Batut, J., Daveran-Mingot, M.L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M., and Kahn, D. (1989) *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J. 8:1279-1286.

Beckman, D.L., Trawick, D.R., and Kranz, G. (1992) Bacterial cytochrome *c* biogenesis. Genes and Devel 6:268-283.

Beckman, D.L., and Kranz, G. (1993) Cytochromes *c* biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. Proc Natl Acad Sci USA 90:2179-2183.

Bergersen, F.J., and Turner, G.L. (1993) Effects of concentrations of substrates supplied to N2-fixing soybean bacteroids in flow chamber reactions. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 251:95-102.

Biel, S.W., and Biel, A.J. (1990) Isolation of a *Rhodobacter capsulatus* mutant that lacks *c*-type cytochromes and excretes porphyrins. J Bacteriol 172:1321-1326.

Bott,M., Bolliger, M., and Hennecke, H. (1990) Genetic analysis of the cytochrome *c-aa*$_3$ branch of the *Bradyrhzobium japonicum* respiratory chain. Mol Microbiol 4:2147-2157.

Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H. (1991) The *Bradyrhizobium japonicum cycM* gene encodes a membrane anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. J Bacteriol 173:6766-6772.

Bott, M., Preisig, O., and Hennecke, H. (1992) Genes for a second terminal oxidase in Bradyrhizobium japonicum. Arch Microbiol 158: 335-43

Bott, M., Thöny-Meyer, L., Loferer, H., Rossbach, S., Tully, R.E., Keister, D., Appleby, C.A., and Hennecke, H. (1995) *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome c_{550} is required for nitrate respirtion but not for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 177:2214-2217.

Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. J. Mol. Biol. 41:458-472.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16:10881-10890.

Creusot, F., Verdiere, J., Gaisne, M., and Slonimski, P.P. (1988) CYP1 (HAP1) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. J Mol Biol 204:263-276.

Daldal, F., Cheng, S., Applebaum, J., Davidson, E., and Prince, R.C. (1986) Cytochrome c_2 is not essential for photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulata*. Proc Natl Acad Sci USA 83:2012-2016.

Darwin A, Hussain H, Griffiths L, Grove J, Sambongi Y, Busby S, Cole J (1993) Regulation and sequence of the structural gene for cytochrome $c552$ from *Escherichia coli*: not a hexahaem but a 50 kDa tetrahaem nitrite reductase. Mol Microbiol 9:1255-1265.

David, M., Daveran, M.L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., and Kahn, M. (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. Cell 54:671-683.

Day, D.A., and Copeland, L. (1991) Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. Plant Physiol. Biochem. 29:185-201.

Delgado, M., Yeoman, K.H., Wu, G., Vargas, C., Davies, A.E., Poole, R.K., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A. (1995) Characterization of the cycHJKL genes involved in cytochrome *c* biogenesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 177:4927-4934.

Devereux, J., Haberli, P., and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl Acids Res 12:387-395.

Dudley, M.E., Jacobs, T.W., and Long, S.R. (1987) Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by Rhizobium meliloti. Planta 171:289-301.

Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M., and Sherman, F. (1987) Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 6:235-241.

Eckhardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584-588.

Eiesenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J Mol Biol 179:125-142.

Forrai, T., Vincze, É., Banfalvi, Z., Kiss, G.B., Randhawa, A., and Kondorosi, ¡. (1983) Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 153:635-643.

Francis, R.T., and Becker, R.R. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. Anal Biochem 136:509-514.

Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J., and Ausubel, F.M. (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18:289-296.

Garcia-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B. (1994) The superfamily of heme-copper oxidases. J. Bacteriol. 176:5587-5600.

Gibson, A.H. (1980) Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In Methods for evaluating biological nitrogen fixation, Bergersen, F.J., ed John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 139-184.

Györgypál, Z., Iyer, N., and Kondorosi, Á. (1988) Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 212:85-92.

Györgypál, Z., Kiss, G.B., and Kondorosi, Á. (1991a) Transduction of plant signal molecules by the Rhizobium NodD protein. BioEssays. 13:575-581.

Györgypál, Z., Kondorosi, É., and Kondorosi, Á. (1991b) Diverse signal sensitivity of NodD protein homologs from narrow and broad host range rhizobia. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:356-364.

Györgypál, Z., and Kondorosi, Á. (1991c) Homology of the ligand-binding regions of Rhizobium symbiotic regulatory protein NodD and vertebrate nuclear receptors. Mol. Gen. Genet. 226:337-340.

Hennecke, H. (1994) The role of respiration in symbiotic nitrogen fixation. In: New Horizons in Nitrogen Fixation, Palacios, R., Mora, J., and Newton, W.E., eds Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 55-64.

Hill, S., Viollet, S., Smith, A.T., and Anthony, C. (1990) Roles of enteric *d*-type cytochrome oxidase in N_2 fixation and microaerobiosis. J. Bacteriol. 172:2071-2078.

de Hollander, J.A., and Stouthamer, A.H. (1980) The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*. Eur. J. Biochem. 111:473-478.

Hussain, H., Grove, J., Griffiths, L., Busby, S., Cole, J. (1994) A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. Mol Microbiol 12:153-163.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96:23-28.

Ish-Horovicz, D., and Burke, J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res 9:2989-2998.

Jording, D., Uhde, C., Schmidt, R., Pühler, A. (1994) The C_4-dicarboxylate transport system of *Rhizobium meliloti* and its role in nitrogen fixation during symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*). Experientia 50:874-883.

Kannenberg, E.L. and Brewin, N.J. (1994) Host-plant invasion by Rhizobium: the role of cell-surface components. Trends Microbiol. 278:277-283.

Kelly, M.J.S., Poole, R.K., Yates, M.G., and Kennedy, C. (1990) Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. J. Bacteriol. 172:6010-6019.

Kijne, J.W. (1992) The *Rhizobium* infection process. In Biological Nitrogen fixation, G.Stacey, R.H.Burris, and H.J.Evans, eds (New York: Chapman and Hall), pp.349-398.

Kim, J., and Rees, D.C. (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry 33:389-397.

Kiss, G.B., Vincze, É., Kálmán, Z., Forrai, T., and Kondorosi, Å. (1979) Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. J Gen Microbiol 113:105-118.

Kitts, C.L., and Ludwig, R.A. (1994) *Azorhizobium caulinodans* respires with at least four terminal oxidases. J. Bacteriol. 176:886-895.

Knauf VC, Nester EW (1982) Wide host-range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. Plasmid 8:45-54.

Kondorosi, Å., Barabás, I., Sváb, Z., Orosz, L., Sík, T., and Hotchkiss, R.D. (1973) Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*. Nature, New Biol 246:153-154.

Kondorosi, Å., Kiss, G.B., Forrai, T., Vincze, É., and Banfalvi, Z. (1977) Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome. Nature 264:525-527.

Krey, R., Pühler, A., and Klipp, W. (1992) A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA potein. Mol. Gen. Genet. 234:433-441.

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

Lang, S.E., Jenney, F.E., and Daldal, F. (1996) *Rhodobacter capsulatus* CycH: a bipartite gene product with pleitropic effects on the biogenesis of structurally different *c*-type cytochromes. J. Bacteriol. 178:5279-5290.

Lathrop, J.T., and Timko, M.P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. Science 259:522-525.

Lawrie, A.C., and Wheeler, C.T. (1975) Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon. I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. New Phytol. 74:429-436.

Layzell, D.B., Hunt, S., Moloney, A.H.M., Fernando, S.M., and del Castillo, L.D. (1990) Physiological, metabolic and developmental implications of O_2 regulation in legume nodules. In: Gresshoff,P.M., Roth, L.E., Stacey, G., and Newton, W.E. (eds) Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Chapman and Hall, New York London, pp 21-32.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J. (1990) Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. 344:781-784.

Loferer H, Hennecke H (1994) Protein disulphide oxidoreductases in bacteria. Trends Biochem Sci 19:169-171.

Mitchell, P. (1991) Foundations of vectorial metabolism and osmochemistry. Biosci. Reps. 11:297-346.

Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. Plant Cell 7:869-885.

Nicholson, D.W., Stuart, R.A., and Neupert, W. (1989) Biogenesis of cytochrome *c1*. J Biol Chem 264:10156-10168.

Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26:101-106.

Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T., and Ohyama, K. (1992) Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. J Mol Biol 223:1-7.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, S., Shiki, Y., Tkeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature 322:572-574.

Orosz, L., Sváb, Z., Kondorosi, Á., and Sík, T. (1973) Genetic studies on Rhizobio-phage 16-3. Genes and functions on the chromosome. Mol Gen Genet 125:341-350.

Page, M.D., and Ferguson, S.J. (1989) A bacterial *c*-type cytochrome can be translocated to the periplasm as an apo form; the biosynthesis of cytochrome cd_1 (nitrite reductase) from *Paracoccus denitrificans*. Mol Microbiol 3:653-661.

Page, M.D., and Ferguson, S.J. (1990) Apo forms of cytochrome c_{550} and cytochrome cd_1 are translocated to the periplasm of *Paracoccus denitificans* in the absence of haem incorporation caused by either mutation or inhibition of haem synthesis. Mol Microbiol 4:1181-1192.

Page, M.D., and Ferguson, S.J. (1995) Cloning and sequence analysis of *cycH* gene from *Paracoccus denitrificans*: the *cycH* gene product is required for assembly of all *c*-type cytochromes, including cytochrome c_1. Mol. Microbiol. 15:307-318.

Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence analysis. Proc Natl Acad Sci 85:2444-2448.

Peoples, M.B., and Craswell, E.T. (1992) Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual cntributions to agriculture. Pl. Soil 141:13-39.

Petrovics, G., Putnoky, P., Reuhs, B.L., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W., and Kondorosi, Á. (1993) The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. Mol.Microbiol. 8:1083-1094.

Pettigrew GW, Moore GW (1987) Cytochromes *c*. Springer Verlag, Berlin. pp.160-179.

Pfeifer, K., Kim, K.-S., Kogan, S., and Guarente,L. (1989) Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. Cell 56:291-301.

Philips, D.A. (1980) Efficiency of nitrogen fixation in legumes. Annu. Rev. Plant. Physiol. 31:29-49.

Preisig, O., Anthamatten, D., and Hennecke, H. (1993) Genes for microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc Natl Acad Sci USA 90:3309-3313.

Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby C. A., and Hennecke, H. (1996) A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 178: 1532-1538.

Putnoky, P., and Kondorosi, ¡. (1986) Two gene cluster of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. J Bacteriol 167:881-887.

Putnoky, P., Grosskopf, E., Ha, D.T.C., Kiss, G.B., and Kondorosi, ¡. (1988) *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. J.Cell Biol. 106:597-607.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, D.T.C., Bánfalvi, Z., and Kondorosi, ¡. (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolisaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J Bacteriol 172:5450-5458.

Ramseier, T.M., Winteler, H.V., and Hennecke, H. (1991) Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes. J Biol Chem 266:7793-7803.

Rao, M.J.K., and Argos,P. (1986) A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta 869:197-214.

Ritz, D., Bott, M., and Hennecke, H. (1993) Formation of several bacterial *c*-type cytochromes requires a novel membrane-anchored protein that faces the periplasm. Mol Microbiol 9:729-740.

Ritz, D., Thöny-Meyer, L., and Hennecke, H. (1995) The *cycHJKL* gene cluster plays an essential role in the biogenesis of *c*-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 247:27-38.

Rossbach, S., Loferer, H., Acuna, G., Appleby, C.A., and Hennecke, H. (1991) Cloning, sequencing and mutational analysis of the cytochrome c_{552} gene (*cycB*) from *Bradyrhizobium japonicum* strain 110. FEMS Microbiol. Lett. 83:145-152.

Rostás, K., Kondorosi, É., Horváth, B., Simoncsits, A., and Kondorosi, Á. (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1757-1761.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.

Savouré, A., Magyar, Z., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi Á., and Kondorosi, É. (1994) Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid

biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago* microcallus suspensions. EMBO J. 13:1093-1102.

Schubert, K.R. (1986) Products of biological nitrogen fixation: synthesis, transport, and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:539-574.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, É., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Gero, S.D., and Kondorosi, Á. (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degree of plant host specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:192-196.

Schultze, M., and Kondorosi, Á. (1996) The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. World J. of Microbiol. Biotechnol. 12:137-149.

Schuster W, Combettes B, Flieger K, Brennicke A (1993) A plant mitochondrial gene encodes a protein involved in cytochrome *c* biogenesis. Mol Gen Genet 239:49-57.

Sik, T., and Barabas, I. (1977) The correlation of nitrate reductase and nitrogenase in *Rhizobium* symbiosis. In: Newton, W.E., Postgate, J.R., and Rodriguez-Barrueco, C. (eds) Recent Developments in Nitrogen Fixation. Academic Press, London, pp 365-373.

Smit, G., Van Brussel, T.A.N., Kijne, J.W. (1993) Inactivation of a root factor by ineffective *Rhizobium*: A molecular key to autoregulation of nodulation in *Pisum sativum*. In New Horizons in Nitrogen Fixation, R. Palacios, J. Mora, and W.E. Newton, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), p. 371.

Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K., and Escamilla, E. (1989) Isolation of a *Rhizobium phaseoli* mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 171:465-472.

Soberón, M., Aguilar, G.R., and Sánchez, F. (1993) *Rhizobium phaseoli* cytochrome *c*-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. Mol Microbiol 8:159-166.

Szabó, I.M. (1989) A bioszféra mikrobiológiája. Akadémiai Kiadó, Budapest.

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

Thöny-Meyer, L., Stax, D., and Hennecke, H. (1989) An anusual gene cluster for the cytochrome bc_1 complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. Cell 57:683-697.

Thöny-Meyer, L., James, P., and Hennecke, H. (1991) From one gene to two proteins: The biogenesis of cytochromes *b* and c_1 in *Bradyrhizobium japonicum*. Proc Natl Acad Sci USA 88:5001-5005.

Thöny-Meyer, L., Ritz, D., and Hennecke, H. (1994) Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. Mol Microbiol 12:1-9.

Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Künzler, P., Ritz, D., and Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. J. Bacteriol. 177:4321-4326.

Tully, R.E., Sadowsky, M.J., and Keister, D.L. (1991) Characterization of cytochromes c_{550} and c_{555} from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, mutagenesis, and sequencing of the c_{555} gene (*cycC*). J. Bacteriol. 173:7887-7895.

Turgeon, B.G., and Bauer, W.D. (1982) Early events in the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Time course and citology of the initial infection process. Can. J. Bot. 60:152-161.

Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W. (1992) Induction of pre-infection thread structures in leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. Science 257:70-71.

Vargas, C., Wu, G.,Davies, A.E., and Downie, J.A. (1994) Identification of a gene encoding a thioredoxin-like product necessary for cytochrome *c* biosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 176: 4117-4123.

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J. Bacteriol. 172:4295-4306.

Verma, D.P.S. (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of Rhizobium. Plant Cell 4:373-382.

Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res 14:4683-4690.

Wieseler, B., Schiltz, E., and Müller, M. (1992) Identification and solubilization of a signal peptidase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. FEBS Letters 298:273-276.

Witty, J.F., and Minchin, F.R. (1990) Oxygen diffusion in the legume root nodule. In: Gresshoff,P.M., Roth, L.E., Stacey, G., and Newton, W.E. (eds) Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Chapman and Hall, New York London, pp 285-292.

Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T. (1994) Rhizobium Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. Plant Cell 6:1415-1426.

Yanish-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotid sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.

Zhang, L., and Guarente, L. (1995) Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. EMBO J. 14:313-320.