

B 3528

**A RHIZOBIUM MELILOTI RKP GÉNJEI ÁLTAL MEGHATÁROZOTT
FEHÉRJÉK KAPSZULÁRIS POLISZACHARIDOK SZINTÉZISÉBEN ÉS
TRANSPORTJÁBAN VESZNEK RÉSZT**



PhD értekezés tézisei

**Készítette:
Kiss Ernő
MTA Szeged Biológiai Központ
Genetikai Intézete**

**Témavezető:
Dr. Kondorosi Ádám**

Szeged, 1998

BEVEZETÉS

Az élő szervezeteket felépítő egyik leggyakoribb elem a nitrogén. A föld nitrogén készletének jelentős része gáz halmazállapotú, amelyet az élőlények túlnyomó többsége nem képes közvetlenül beépíteni saját anyagaiba. Az úgynevezett diazotróf mikroorganizmusok rendelkeznek azonban azzal a képességgel, hogy a molekulás nitrogént ammóniává redukálják, növelve a talaj hasznosítható nitrogéntartalmát. Az ammónia már képes beépülni a növények aminosavaiba, onnan pedig más nitrogén tartalmú vegyületeibe. A lebontó, denitrifikáló folyamatok eredményeképpen a szerves vegyületekből felszabaduló nitrogén visszakerül a légkörbe. Az ökoszisztéma nitrogén körforgalmának egyensúlyához tehát folyamatos $N_2 \rightarrow NH_3$ átalakulás, azaz nitrogénkötés szükséges.

A termőterületek intenzív mezőgazdasági tevékenység miatti nitrogénvesztését napjainkban műtrágyázással pótolják. Ez azonban csak igen rövid távon nyújthat megoldást, hiszen ez a módszer igen költséges és nagymértékben károsítja a környezetet. A talajból az élővizekbe mosódó nitrogén-sók tönkreteszik azok élővilágát, szennyezik az ivóvíz készleteket, és a tavak eutrofizációjához vezetnek. A gyártás során a légkörbe kerülő nitrogén-oxidok fokozzák az üvegházhatást, ami bolygónk globális felmelegedését segíti elő. Mindez beláthatatlan veszteséget és veszélyt jelent az emberiség számára. Becslések szerint 2020-ra a Föld lakóinak száma elérheti a 9 milliárdot. Ez emberiség ételtermelésének óriási terhet fog jelenteni a mezőgazdaságnak. Előtérbe kerülnek tehát azok a kutatási területek, amelyek eredményei felhasználhatók az élelemtermelés fokozására. A biológiai úton megkötött nitrogén mennyiségének növelése tehát a probléma elméleti érdekességén túl, égető gyakorlati szükségesség is. Így érthető, hogy a kutatások egy része a biológiai nitrogénkötés megismerésére, fokozásának és kiterjesztésének lehetőségeire irányul.

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. A N_2 -kötés szimbiotikus formája a leghatékonyabb, hiszen itt a folyamat magas energia igényének nagy részét a növény fedezi. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulása során mindkét partner genetikai rendszerének összehangolt működésére van szükség, melyet a növényi sejtek és a baktériumok közötti egyedi szignálmolekulák cseréjén alapuló kommunikáció biztosít. Ennek eredményeként jön létre a bakteroidokat tartalmazó szimbiotikus gyökérgümő, melyben a levegő nitrogénjének megkötése történik. Kutatócsoportunk, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Nitrogénkötési csoportja elsősorban a szimbiózis kialakulásának bakteriális oldalával foglalkozik. Érdeklődésünk középpontjában a *Rhizobium meliloti* és a lucerna (*Medicago sativa*) között létrejövő szimbiózis során szerepet játszó bakteriális szignálmolekulák, és az ezeket meghatározó gének állnak.

A sejtfelszíni molekulák meghatározó szerepet játszanak mind a parazita, mind a szimbionta mikroorganizmusok gazdasejtekkel való kölcsönhatásakor. Ezek az anyagok kerülnek először közvetlen kapcsolatba a sejtek egymással való érintkezése során, ezért joggal feltételezhetjük, hogy a sejtek felületén található molekulák döntő módon befolyásolják a felismerési és kommunikációs folyamatokat. A baktériumok felszínét túlnyomó többségben poliszacharid jellegű anyagok borítják. Helyzetükből adódóan ezek a molekulák határozzák meg elsősorban a baktériumok és környezetük kapcsolatát. Egyre több kísérleti adat támasztja alá azt a feltételezést, hogy a sejtfelszíni poliszacharidok kulcsszerepet játszanak a szimbiotikus gümő inváziója során is, mint specifikus bakteriális szignálmolekulák.

KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK

A dolgozatban leírt munka folytatása a csoportunk által elkezdett kutatási téma egy részének. A teljes program a szimbiotikus gümő fejlődésében szerepet játszó bakteriális gének izolálása és jellemzése, valamint a növény és baktérium kölcsönhatásában betöltött szerepük felderítése.

A csoportban már korábban izolált nitrogénkötésre képtelen (Fix⁻) *R. meliloti* mutánsokat Putnoky Péter és mtsai. csoportosították aszerint, hogy a szimbiózis a gümőfejlődés melyik stádiumában áll le az adott mutáció hatására. Érdeklődésük elsősorban azon mutánsok felé fordult, melyek által indukált gümőkben nem expresszálódnak a szimbiózis-specifikus növényi gének, valamint a baktérium nitrogénkötési génjei (*nif*) sem fejeződnek ki, azaz a gümőfejlődés még ezen lépések előtt leáll. Ennek egyik oka lehet az, hogy a növény nem kapja meg az adott szakaszban szükséges bakteriális szignált. E mutánsok segítségével lehetőség nyílt olyan bakteriális gének azonosítására, melyek a növény számára küldött, az adott fejlődési stádiumban szükséges jelmolekula előállításában vesznek részt.

Felhasználva a korai stádiumú Fix⁻ mutánsokat *R. meliloti* génbankból komplementáció segítségével izoláltak 4 különböző, *fix* géneket hordozó szakaszt (Putnoky és mtsai, 1988). Ezek közül legrészletesebben a *fix-23* régiót jellemezték. Kiderült, hogy a régióba térképezhető Fix⁻ mutációk egyben rezisztenciát okoznak a *R. meliloti* 41 törzs specifikus bakteriofágjával, a 16-3 faggal szemben. E rezisztencia okának az bizonyult, hogy a *fix-23* mutáns baktériumok sejtfelszínén nem képesek megtapadni a fág részecskék (Putnoky és mtsai, 1990). A jelenség feltételezhető magyarázata, hogy a fág receptora megváltozik a régióban történt mutáció következtében. Ez esetben ugyanez a struktúra, vagy ennek egy része játszhat szerepet a szimbiotikus gümőfejlődés során is.

A *fix-23* régió bal oldalának szerkezeti és funkcionális analizisét Petrovics György végezte. Vizsgálatai során a következők jelentősebb következtetésekre jutott:

Megállapította, hogy a *fix-23* génnek olyan sejtfelszíni struktúra felépítésében vesznek részt, ami poliszacharid természetű fágreceptorként szolgál. Izolálta és tisztította a struktúrát, melynek kromatográfiás vizsgálatai szerint a *fix-23* gének által meghatározott molekula egy új típusú sejtfelszíni poliszacharid. Meghatározta a *fix-23* régió első komplementációs egységének nukleotid sorrendjét. A komputeres analizis szerint a feltételezett fehérjetermékek különböző zsírsav szintáz, és poliketid szintáz enzimekkel mutatnak homológiát. A szekvencia analizis alapján feltételezett hat új zsírsav szintáz génben létrehozott mutáció nem okozza a baktérium pusztulását, vagyis ezek a gének nem a *R. meliloti* esszenciális zsírsav szintéziséért felelősek. A kísérleti eredmények alapján valószínűsíthető volt, hogy ezen gének egy szimbiózis specifikus sejtfelszíni struktúra zsírsav részének felépítésében vesznek részt (Petrovics és mtsai, 1993). A feltételezett poliszacharid molekula biokémiai vizsgálatára csoportunk együttműködést alakított ki a Complex Carbohydrate Research Centerben (Athens, Georgia, USA) található, R. Carlson vezette csoporttal, amelynek fő kutatási területe a bakteriális sejtfelszíni poliszacharidok analizise. Az AK631 törzs által termelt poliszacharidok részletes biokémiai vizsgálata során kiderült, hogy a *fix-23* régió nem LPS, hanem egy *R. meliloti*-ban még nem azonosított kapszuláris poliszacharid szintéziséhez szükséges (Petrovics és mtsai, 1993; Reuhs és mtsai, 1993). Megállapították, hogy a *fix-23* régió első komplementációs csoportjába térképeződő Fix⁻ mutánsok sejtfelszínéről hiányzik ez a KPS molekula (Petrovics és mtsai, 1993). Ez volt az első bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a KPS szerepet játszik a szimbiózis kialakulásában.

CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat eredményeit képező munka megkezdésekor ismeretes volt, hogy a *R. meliloti* 41 törzs *fix-23* régiójában egy új típusú sejtfelszíni poliszacharidnak (KPS) a bioszintéziséhez szükséges gének találhatóak. Ezek közül hat gén (az 1. komplementációs csoportban) a zsírsav szintáz génekkel mutatott homológiát. Ismeretlenek voltak azonban a poliszacharid alegységek szintéziséhez szükséges gének.

Ennek ismeretében tűztem ki célul a KPS termelésben résztvevő további gének izolálását és analizését, az általuk meghatározott bakteriális jelmolekula vizsgálatát.

A célt az alábbi részfeladatok megoldása során próbáltam elérni:

- A *fix-23* régió jobb oldalán található 4.5 kb-nyi DNS szakasz szubklonozása
- Az itt található komplementációs egységek szekvenciájának meghatározása
- A kapott szekvenciák komputeres analízise, a lehetséges kódoló nyitott leolvasási keretek (ORF-ek) azonosítása
- A feltételezhető fehérje termékek összehasonlítása adatbázisokban tárolt aminosav szekvenciákkal.
- A *R. meliloti* 41 törzs infekciós képességében fontos szerepet játszó KPS molekulát kódoló további genomi régiók azonosítása, izolálása, és az azonosított gének szerepének megismerése a *fix-23* régiónál ismertetett munkamenethez hasonló módon.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Tn5 transzpozon mutagenézis
- rekombináns DNS-technikák
- DNS bázisszortrend meghatározás
- komputeres szekvencia analízis
- kapszuláris poliszacharidok izolálása
- poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)
- immunoblot analízis
- mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR)
- enzimkötött immuno-adszorpciós (ELIZA) vizsgálat

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *fix-23* régió II., III., és IV. komplementációs egységének szekvencia analízise

A *fix-23* régió jobb oldalán elhelyezkedő három komplementációs csoportban található gének megismerése érdekében meghatároztunk a korábban irányított Tn5 mutagenézis segítségével behatárolt régió nukleotidszortrendjét.

A DNS-szekvenciát számítógépes programcsomagok felhasználásával analizáltuk. Azonosítottunk a lehetséges fehérje kódoló régiókat, az úgynevezett nyitott leolvasási kereteket (Open Reading Frame, ORF). Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeképpen négy, egy irányba átiródó, tipikus *R. meliloti* kodonhasználatot mutató ORF-et sikerült azonosítanunk, amelyet *rkpGHJ* géneknek neveztünk el.

A négy ORF által meghatározott aminosav szekvenciákat számítógépes analízisnek vetettük alá. A gének által meghatározott aminosav sorrendeket a Blast homológia kereső programcsomag segítségével összehasonlítottuk adatbankokban tárolt fehérje szekvenciákkal. Megállapítottuk, hogy az RkpG kettes típusú acil-transzferázokkal, az RkpH ribitol-vagy más néven rövid lánchosszúságú alkohol-dehidrogenázokkal, az RkpJ pedig baktériumok kapszuláris poliszacharidjának szintézisében és transzportjában résztvevő enzimekkel homológ. (Kiss és mtsai, 1997)

2. A *fix-23* régióba térképeződő mutánsok által termelt KPS biokémiai analízise

A *fix-23* mutáns és a vad típusú *Rhizobiumokból* poliszacharid izolátumokat készítettünk, amelyeket poliakrilamid gélelektroforézis segítségével analizáltunk.

Kimutattuk, hogy a mutációk következtében baktériumok felületéről hiányoznak a nagy mólsúlyú kapszuláris poliszacharidok.

Elvégeztük a baktérium törzsek által termelt poliszacharidok immunkémiai vizsgálatát, a vad típusú *R. meliloti* 41 törzs sejtfelszíne ellen indukált poliklonális ellenanyag felhasználásával. Megállapítottuk, hogy a vizsgált *fix-23* mutánsok nem termelnek, vagy a sejtfelszínükre nem exportálnak jelentős mennyiségű nagymólsúlyú KPS-t.

ELIZA-val meghatároztuk a különböző mutáns baktériumok sejtfelszínén található KPS egymáshoz viszonyított mennyiségét.

Az egyik mutánsból származó tisztított KPS NMR spektrumát összehasonlítottuk a vad típusú baktériumból izolált KPS-ével. Megállapítottuk, hogy a KPS főbb alkotóelemeit jelentő rezonancia görbék a mutáns és a vad típusú baktérium esetében azonosak, amiből arra következtettünk, hogy a mutáns baktérium a vad típusal megegyező szerkezetű KPS-t termel (Kiss és mtsai, 1997).

3. A *R. meliloti* kapszuláris poliszacharid szintézisében résztvevő további géncsoportok azonosítása

A *R. meliloti* baktérium random Tn5 transzpozíciós mutagenézise után, további KPS termelésében hibás mutánsokat izoláltunk amelyeket fág tapadási vizsgálatok, genetikai komplementációs kísérletek valamint növényi tesztek segítségével jellemeztünk.

Az újonnan izolált mutánsok segítségével egy *R. meliloti* génbankból izoláltuk a mutációkat komplementáló DNS szakaszokat. Ily módon egy különálló (*rkp-2* régió) és két, egymással átfedő (*rkp-3* régió) kozmid klónt azonosítottunk.

Az új régiók helyspecifikus transzpozíciós mutagenézisével meghatároztuk a KPS szintézisben szerepet játszó gének elhelyezkedését (Kereszt és mtsai, beküldve).

4. Az *rkp-2* régió mutánsainak analízise

Az *rkp-2* régióba térképeződő mutánsok által termelt poliszacharidokat izoláltuk és PAGE gélen analizáltuk. Megállapítottuk, hogy egyes mutánsok KPS termelésére képtelenek, valamint a mutánsok lipopoliszacharid (LPS) mintázata is különbözik a vad típustól.

A mutánsok szimbiotikus képességeit gümözüsi tesztben vizsgáltuk. A KPS és LPS termelésben egyaránt hibás mutánsok egyben képtelenek voltak effektív szimbiózis létrehozására, azaz *Fix*, míg a csak eltérő LPS mintázatot mutató törzsek *Fix*⁺ fenotípust mutattak (Kereszt és mtsai, beküldve).

5. Az *rkp-2* régió szekvencia analízise

A régióban található gének megismerése érdekében meghatároztuk a 3,6 kb hosszúságú *SphI-BamHI* fragmentjének nukleotidsorrendjét. A számítógépes szekvencia analízissel 2 egyirányban átiródó, rhizobium-szerű kodonhasználatot mutató ORF-et azonosítottunk, amelyeket *lpsX* és *rkpK* géneknek neveztünk el.

Megállapítottuk, hogy a két gén által kódolt fehérjék difoszfó-cukrok bioszintézisében résztvevő enzimekhez hasonlóak (Kereszt és mtsai, beküldve).

6. Az *rkp-3* régió mutánsainak analízise

A mutánsok által termelt poliszacharidokat PAGE géleken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a baktériumok KPS⁻ fenotípusiak.

A mutánsok szimbiotikus képességeit növényi tesztben ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy a KPS⁻ mutánsok egyben *Fix*⁻ fenotípusúak (Kiss és mtsai, közlés előtt).

7. Az *rkp-3* régió szekvencia analízise

A régió mutációk által behatárolt 8,5 kb hosszúságú darabját szubklónoztuk, majd nukleotid sorrendjét meghatároztuk. 7 ORF-et azonosítottunk, amelyeket *rkpLMNOPQR*-nek neveztünk el. Előzetes szekvencia adatok alapján még egy ORF-et (*rkpS*) azonosítottunk, ennek pontos helyzete és orientációja azonban még nem ismert. Adatbanki

protein szekvenciákkal összevetve mind a kilenc ORF hasonlóságot mutat különböző cukor, illetve poliszacharid bioszintézisben résztvevő enzimekkel (Kiss és mtsai, közlés előtt).

8. A KPS szintézis és export modellje

A dolgozatban tárgyalt új eredmények birtokában összeállítottuk a *R. meliloti* KPS szintézisének és sejtfelszínre való exportjának modelljét (Kiss és mtsai, közlés előtt).

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat a lucerna partnere, a *Rhizobium meliloti* szimbiotikus gümőfejlődésben résztvevő három géncsoportjának (*rkp1-2-3*) szerkezeti és funkcionális analizését tárgyalja. Az általunk izolált három független géncsoportban közös, hogy a gének mutációja esetén (i) a baktériumok nem képesek effektív szimbiózis létrehozására a lucerna növényen, (ii) a mutáns baktériumok sejt felszínén nem képesek megtapadni a 16-3 fág részecskéik, (iii) sejt felszíni poliszacharidjaik mennyisége és/vagy mintázata megváltozik. Vizsgálataink során a következő eredményekre jutottunk:

-Megállapítottuk, hogy mindhárom régió egy kapszuláris poliszacharid szintéziséért felelős.

-*rkp* régiók mutánsai Fix⁻ fenotípusúak valamint a KPS termelésben és exportban hibásak.

-M13 és pUC19 vektorokba épített átfedő DNS-fragmentek szekvencia analizise segítségével meghatároztuk az *rkp-1* és *rkp-2* régió teljes valamint az *rkp-3* régió 8,5 kb-os darabjának nukleotid-sorrendjét.

-Számítógépes analizissal, a három régióban összesen 14 új nyitott leolvasási keretet (ORF) azonosítottunk. Az ORF-eket *rkpGHIJ,K,LMNOPQ,R,S* és *rlpA* géneknek neveztük el.

-Kimutattuk, hogy a gének által kódolt fehérjék olyan bakteriális fehérjékhez hasonlítanak, melyek szintén sejt felszíni poliszacharidok szintéziséért felelősek.

-Eredményeink alapján felállítottuk a *R. meliloti* kapszuláris poliszacharid szintézisének és transzportjának modelljét.

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK:

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. 179, 2132-2140.

KERESZT, A., KISS, E., REUHS, B., CARLSON, R. W., KONDOROSI, A., PUTNOKY, P. Novel *rkp* gene clusters of *Rhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and the invasion of the symbiotic nodule : *rkpK* gene encodes for a UDP-glucose dehydrogenase (J. Bacteriol. beküldve).

KISS E., PETROVICS GY., 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.

KISS, E., PETROVICS, GY., PUTNOKY P., KERESZT A., DUSHA, I., KONDOROSI A. (1994). The *fix-23* genes of *Rhizobium meliloti* are involved in the production of a

capsular polysaccharide which plays a role in nodule development. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, Edinburgh. (poszter)

KISS, E., PETROVICS, GY., PUTNOKY P., KERESZT A., DUSHA, I., KONDOROSI A. (1994). A gümőfejlődésben résztvevő egyik géncsoport kapszuláris poliszacharidok szintéziséért felelős. Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája, Debrecen. (előadás)

KERESZT, A., KISS, E., PUTNOKY P., PETROVICS, GY., REUHS, B., CARLSON, R. W., KONDOROSI A. (1996). A szimbiótikus gümő fejlődésében szerepet játszó kapszuláris poliszacharid termelésének genetikai háttere *Rhizobium meliloti*ban A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai szakosztálya I. Munkaértekezlete, Seregélyes (előadás)

KISS, E., (1996) A gümőfejlődésben résztvevő egyik géncsoport kapszuláris poliszacharidok szintéziséért felelős. Doktoranduszok I. Országos Konferenciája, Debrecen. (előadás)

KERESZT, A., KISS, E., KONDOROSI, A., PUTNOKY, P. (1997) Isolation and characterisation of novel *Rhizobium meliloti* regions involved in KPS production. Eight International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, Párizs. (poszter)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

KISS, E. AND KONDOROSI, A. (1997). Complete sequence of a *Rhizobium* plasmid carrying genes necessary for symbiotic association with the plant host. BioEssays 19, 843-846.

KISS, E., KERESZT, A., OLÁH, B., MERGAERT, P., STAEHELIN, C., DOWNIE, J.A., DAVIES, A. E., KONDOROSI, A., KONDOROSI, E. Negative regulation of nodulation genes by *nolR* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM (Mol. Plant-Microbe Int. revízió alatt).

KISS, E., KERESZT, A., OLÁH, B., DOWNIE, J. A., KONDOROSI A., KONDOROSI E. (1996) Negative regulation of the nodulation genes by *NolR* in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM. 2nd European Nitrogen Fixation Conference, Poznan. (poszter+előadás)

DUSHA, I., OLÁH, B., KISS, E., KISS, P., BOTTKA, S., KONDOROSI, A. (1996) Mutations in two nitrogen regulatory genes affect symbiotic signal production by *Rhizobium meliloti* 2nd European Nitrogen Fixation Conference, Poznan. (poszter).