

**A c-típusú citokrómok biogenezisében résztvevő fehérjék  
szerepe és génjeik szabályozása *Sinorhizobium*  
*meliloti*-ban**

Ph.D. értekezés

**Cinege Gyöngyi**

Témavezető: Dr. Dusha Ilona

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem  
2004

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete igazgatójának, Dr. Raskó Istvánnak, hogy biztató figyelemmel kísérte és támogatta munkámat.

Köszönetet mondok csoportvezetőmnek, Dr. Dusha Ilonának, hogy a Nitrogénkötési Csoporthoz csatlakozhattam. Hasznos tanácsaival, kritikai észrevételeivel, bizalmával és támogatásával nagy segítséget nyújtott.

Köszönettel tartozom Dr. Borzi Juditnak és Kertész Sándornak a lelkiismeretes asszisztensi munkáért.

Hálámat fejezem ki Dr. Kereszt Attilának, Dr. Balogh Gábornak és Dr. Szekeres Miklósnak munkám során nyújtott segítségükért és jótanácsaikért.

Köszönetemet fejezem ki tutoromnak, Dr. Gausz Jánosnak azért, hogy a szíves segítségére mindenkor számíthattam.

## TARTALOM

Rövidítések jegyzéke	5
1. BEVEZETÉS	6
2. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK	9
2.1. A szimbiotikus gyökérgümő kialakulása	9
2.2. A szimbiotikus gyökérgümő mikroaerob környezete	10
2.3. A légköri nitrogén redukcióját végző enzimrendszer szerkezete és működése	11
2.4. A nitrogénkötésben szerepet játszó <i>nif/fix</i> gének szabályozása <i>S. meliloti</i> -ban	12
2.5. Bakteriális elektrontranszport láncok	14
2.6. A szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc	17
2.7. A <i>c</i> -típusú citokrómok	20
2.8. A citokróm <i>c</i> hem liáz komplex	23
3. CÉLKITŰZÉSEK	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
4.1. Baktérium törzsek és tenyésztési körülmények	27
4.2. Rekombináns DNS technikák és szekvencia analízis	30
4.3. Plazmidok előállítása	30
4.4. Mutáns <i>S. meliloti</i> törzsek előállítása	35
4.5. A <i>c</i> -típusú citokrómok és a protoporfirin IX kimutatása	36
4.6. “Respirációs” nitrát-reduktáz aktivitás kimutatása	36
4.7. Növényi teszt és növényi szárazsúly meghatározás	37
4.8. $\beta$ -galaktozidáz aktivitás meghatározása	37
5. EREDMÉNYEK	39

5.1. A <i>cyc</i> gének mutációjának hatása a hem bioszintézisre	39
5.2. A Cych fehérje N-terminális szakaszának szerepe a PPIX szint meghatározásában	43
5.3. A Cych fehérjében található tetratrikopeptid domének szerepének vizsgálata	44
5.4. A <i>CycH</i> mutánsok Fix fenotípusának komplementálása	46
5.5. A <i>cycHJKL</i> operon kifejeződése mikroaerob körülmények között indukálódik	49
5.6. A <i>cycHJKL</i> operon mikroaerob indukciójának szabályozása	49
6. MEGVITATÁS	55
6.1. A Cych fehérje N-terminális funkcionális moduljának szerepe a <i>c</i> -típusú citokrómok biogenezésében	55
6.2. A Cych fehérje C-terminális részének szerepe a <i>c</i> -típusú citokrómok biogenezésében	58
6.3. A <i>cycH</i> mutánsok Rnr és Fix fenotípusának komplementálása különböző genetikai elemeket igényel	59
6.4. A <i>cyc</i> operon mikroaerob indukciójának szabályozása	61
7. IRODALOMJEGYZÉK	63
TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	74
ÖSSZEFOGLALÁS	75
SUMMARY	79

## Rövidítések jegyzéke

ADP	adenozin difoszfát
ATP	adenozin trifoszfát
bp	bázispár
CCHL	citokróm <i>c</i> hem liáz
Fix fenotípus	nitrogénkötési fenotípus
Nod fenotípus	gümőképzési (nodulációs) fenotípus
PCR	polimeráz láncreakció
PPIX	protoporfirin IX
SDS	nátrium dodecil szulfát
Rnr	respirációs nitrát-reduktáz működés
TPR domén	tetratrikopeptid domén

## 1. BEVEZETÉS

A talajban található nitrogéntartalmú vegyületek mennyisége a növényi növekedésnek az egyik fő limitáló tényezője. A földi atmoszféra 78,1 %-át  $N_2$  gáz alkotja, azonban a növényi szervezetek ezt a nitrogénforrást nem tudják hasznosítani. Bizonyos prokarióta, úgynevezett diazotróf mikroorganizmusok, azzal a tulajdonsággal rendelkeznek, hogy képesek megkötni, azaz ammóniává redukálni a légköri nitrogént és ezáltal más élőlények számára is felhasználhatóvá tenni. Az élővilág szempontjából kevésbé hatékonyak a szabadon élő nitrogénkötő baktériumok (pl. *Klebsiella*, *Azotobacter*). Más mikroorganizmusok (pl. *Azospirillum*) növényekkel asszociációban élnek és redukálják a légköri nitrogént. A kötött nitrogén egy részét így a növény is hasznosíthatja. A legfontosabb csoportot azonban a szimbiotikus nitrogénkötő baktériumok, a *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Mesorhizobium* (*Rhizobiaceae*) fajok alkotják. E prokarióta szervezetek más-más pillangósvirágú növényfaj gyökerein vagy szárán hoznak létre szimbiotikus gümöket, melyben az átalakult baktériumok, a bakteroidok redukálják a nitrogént.

A szimbiózis a két partner közti molekuláris szintű jelcsere során alakul ki. A  $N_2$  biológiai redukcióját egy multimer enzimkomplex, a nitrogénáz katalizálja. Aerob körülmények között a nitrogénáz alegységeit kódoló *nifHDKE* operon transzkripciója gátolt, a jelenlevő enzimkomplex pedig irreverzibilisen denaturálódik. A gümő belsejében a morfogenezis során mikroaerob körülmények alakulnak ki. A mikroaerob környezetet egyrészt a gümőszövet morfológiai sajátosságai biztosítják, mivel a szimbiotikus gümő nitrogénkötő zónájának határát képező növényi szövetek egy úgynevezett oxigén-diffúziós gátat képeznek, megakadályozva az oxigén beáramlását a környezetből. Az alacsony oxigénkoncentrációt biztosító másik faktor egy növényi nodulin, a leghemoglobin, mely reverzibilisen megköti a szabad oxigént, ezáltal a szimbiotikus

gümőben az oxigén koncentrációja az aerob környezetben található 250  $\mu\text{M}$ -hoz képest jelentősen lecsökken és elérheti a 3-30 nM értéket is (Fischer 1994). Az alacsony oxigénkoncentrációnál számos nitrogénkötésben szerepet játszó gén indukálódik (pl. *nif* és *fix* gének), és e körülmények megfelelnek az oxigénérzékeny nitrogenáz enzim működésének is. Emellett azonban, mivel a nitrogénkötés energiaigényes folyamat, nagy mennyiségű energiára is szükség van. Egyetlen nitrogén molekula ammóniává redukálása 16 ATP molekulát vesz igénybe. Az energiát termelő, aerob körülmények között működő légzési elektrontranszport láncok mellett a szimbiotikus baktériumoknál az evolúció során kialakult egy, csak szimbiotikus körülmények között működő légzési elektrontranszport lánc is. A szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc nagy oxigén-affinitású *cbb<sub>3</sub>* típusú terminális citokróm *c* oxidázát alkotó fehérjék mikroaerob körülmények között szintetizálódnak, és működésük biztosítja, hogy a baktériumok kevés oxigén jelenlétében is megfelelő mennyiségű energiát termeljenek a nitrogénkötés számára. Alacsony oxigén koncentráció és elegendő energiaforrás mellett a baktériumok ammóniává redukálják a levegő nitrogénjét. A kötött nitrogén ammónium formájában diffúzióval, vagy legújabb adatok szerint aszparagin formájában aktív transzporttal (Lodwig és mtsai. 2003) átjut a gazdanövénybe, ahol biokémiai folyamatok során beépül a fehérjékbe, nukleinsavakba és egyéb szerves vegyületekbe. A gazdanövény eközben a fotoszintézis termékeivel és aminosavakkal látja el a baktériumokat, ezáltal szén, energia és nitrogénforrást biztosítva azoknak (Werner 1992).

Munkánk során a nitrogénkötésben lényeges szerepet betöltő *c*-típusú citokrómok biogenezisében résztvevő Cyc fehérjék funkcióját vizsgáltuk a *Sinorhizobium meliloti* szimbiotikus modell mikroorganizmusban. A Cych fehérje különböző doménjeinek a szerepére tértünk ki részletesen. A továbbiakban pedig a Cyc fehérjét kódoló *cycHJKL* operon

kifejeződését tanulmányoztuk aerob és mikroaerob körülmények között, valamint ennek az operonnak a mikroaerob indukcióját szabályzó fehérjét azonosítottuk.



## 2. KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK

### 2.1. A szimbiotikus gyökérgümő kialakulása

A szabadon élő nitrogénkötő prokariótákkal szemben a talajlakó *Rhizobium*-ok a gazdanövényen kialakított szimbiotikus gümőkben, a növényi sejtek belsejében képesek megkötni a légköri nitrogént. A szimbiotikus gyökérgümők kialakulásához azonban a partnerek kölcsönös felismeréséből, valamint több kommunikációs és fejlődési lépésből álló bonyolult folyamat vezet. A *Rhizobium*-ok és a pillangósvirágú növények között kialakuló kapcsolat specifikus, azaz egy adott baktériumfaj csak bizonyos növényfajokkal képes szimbiózist létesíteni. A szimbiotikus partnerek kölcsönös felismerését jelmolekulák határozzák meg. E kölcsönhatás első jeleit a növény bocsátja ki a talajba flavonoid típusú vegyületek formájában, melyek a baktériumokban folyamatosan átíródó egy vagy több *nodD* gén termékével lépnek kapcsolatba (Györgypál és mtsai. 1991). *S. meliloti*-ban három NodD fehérje ismert, melyek a C-terminális részükben térnek el egymástól, és ez határozza meg az eltérő flavonoid felismerő képességüket. A NodD fehérjék egy DNS-kötő motívumot tartalmaznak, mellyel a *nod* gének transzkripció startpontja előtt elhelyezkedő cisz-regulátor DNS-szakaszhoz, az úgynevezett *nod*-boxhoz kapcsolódnak, és a megfelelő növényi indukálószer jelenlétében aktiválják a *nod* gének transzkripcióját (Rostás és mtsai. 1986). A Nod fehérjék a baktérium válaszjelét, a Nod faktorokat hozzák létre. A baktérium által kiválasztott Nod faktorok a gazdanövény gyökerén a szimbiotikus gümő kialakulását indukálják. A gazdanövény gyökérszőrei deformálódnak, begömbölyödnék és körülveszik a magtapadt *Rhizobium*-okat. A gyökérszőr külső kéregsejtjei morfológiailag megváltoznak és kialakítják az infekciós fonalakat, melyeken keresztül a baktériumok bejutnak a gyökér belsejébe. Az infekciós fonalak kialakulásával egyidőben a gyökér belsejében levő egyes kéregsejtek osztódásnak indulnak és létrejön a gümőmerisztéma,

mely a későbbiekben létrehozza a gümő szöveteit. Az infekciós fonalakban a baktériumok folyamatosan osztódnak és a növényi sejtek citoplazmájával történő közvetlen érintkezés nélkül eljutnak a gümő belsejébe. Itt egy endocitózisszerű folyamat útján, peribakteroid membránnal (egy speciális növényi eredetű membrán) körülvéve bekerülnek a gümősejtek citoplazmájába (Verma 1992). Idáig eljutva nem osztódnak többé, azonban számos változáson keresztül bakteroidokká alakulnak. A bakteroidokat tartalmazó sejtek a gümő központi szöveteiben helyezkednek el, melyeket kívülről egy szállítóyalábokat tartalmazó parenchima szövet vesz körül. A gümő nitrogénkötő zónájában sejtenként több ezer bakteroid végzi a levegő nitrogénjének redukálását, melyhez az energiaforrást a gazdanövény által a fotoszintézis során előállított tápanyagok szolgáltatják.

## **2.2. A szimbiotikus gyökérgümő mikroaerob környezete**

A gümőben található alacsony oxigén koncentrációt két faktor határozza meg. Egyrészt a gümő szövettani szerveződése meghatározó szerepű. A mérsékeltövi növényekre jellemző, hogy folyamatosan növekvő, úgynevezett indeterminált gümőket (pl. lucerna gümő) képeznek. Az indeterminált gümők központi szövetei öt zónából állnak (Vasse és mtsai. 1990). Az első zónát képező gümő merisztémát a gümő belseje felé a prefixációs zóna (vagy inváziós zóna), majd a nitrogénkötést végző bakteroidokat magába foglaló nitrogénkötő zóna követi. A legöregebb sejteket tartalmazó öregedési zónában a baktériumok elvesztik funkcióképességüket és degradálódnak. A prefixációs zóna és nitrogénkötő zóna között található a 2-3 sejtrétegből álló amiloplasztiszokban gazdag interzóna, melyről azt feltételezik, hogy meggátolja az oxigén diffúzióját a merisztéma felől a nitrogénkötő zónába. A nitrogénkötő zóna körül található endodermiszről is bizonyították, hogy oxigén-diffúziós gátat képez, megakadályozva a kinti

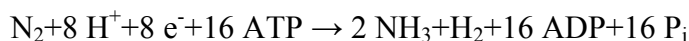
oxigén beáramlását (Soupène és mtsai. 1995). A gümőben található mikroaerob körülményeket meghatározó másik faktor egy növényi nodulin, a leghemoglobin. A leghemoglobin a nitrogénkötő gümőszövetben nagy mennyiségben előforduló gümőspecifikus fehérje, mely arra szolgál, hogy a szabad oxigént reverzibilisen megkösse. Korábbi eredmények szerint a leghemoglobin hem csoportja bakteriális eredetű (Godfrey és Dilworth 1971), azonban az újabb irodalmi adatok arra utalnak, hogy e hem csoportot a gazdanövény állítja elő (O'Brian 1996). A leghemoglobin és az oxigén kötődése nagy sebességgel, míg disszociációjuk lassan megy végbe, így a sejtekben az oxigenált leghemoglobin mennyisége állandóan magas, a szabad oxigénkoncentráció pedig nagyon alacsony szinten marad (Appleby 1984). Oxigén mikroelektóddal kimutatták, hogy a kinti környezethez képest a gümőmerisztéma felől a nitrogénkötő zóna felé haladva fokozatosan csökken az oxigén koncentrációja. A nitrogénkötő zóna oldalsó részein pedig ugrásszerű oxigénkoncentráció csökkenés tapasztalható. Itt közvetlenül az endodermisz alatt az aerob mért 250  $\mu\text{M}$  értékről 1  $\mu\text{M}$ -ra csökken az oxigén koncentrációja (Soupène és mtsai. 1995).

### **2.3. A légköri nitrogén redukcióját végző enzimrendszer szerkezete és működése**

A molekuláris nitrogént redukáló enzimrendszert (Kim és Rees 1994) két fémtartalmú komponens alkotja: az egyik vasat (Fe-fehérje), a másik vasat és molibdént tartalmaz (MoFe-fehérje). A körülbelül 60 kDa molekulatömegű Fe-fehérje, melyet a *nifH* gén kódol, homodimereket képez. Az alegységek közti kapcsolatot négy-négy vas- és kénatomot tartalmazó úgynevezett vas-kén (4Fe-4S) csoport biztosítja. A *nifD* és *nifK* gének által kódolt 240 kDa molekulatömegű MoFe-protein kétféle polipeptidláncból álló heterotetramert alkot (Fischer 1994). A MoFe fehérjéhez kétféle fémtartalmú prosztetikus csoport kapcsolódik, melynek

szintéziséhez további *nif* gének szükségesek. Az elektronoknak a nitrogenáz enzimkomplexhez való szállításában a *fixABCX* gének által kódolt fehérjék vesznek részt (Corbin és mtsai. 1983).

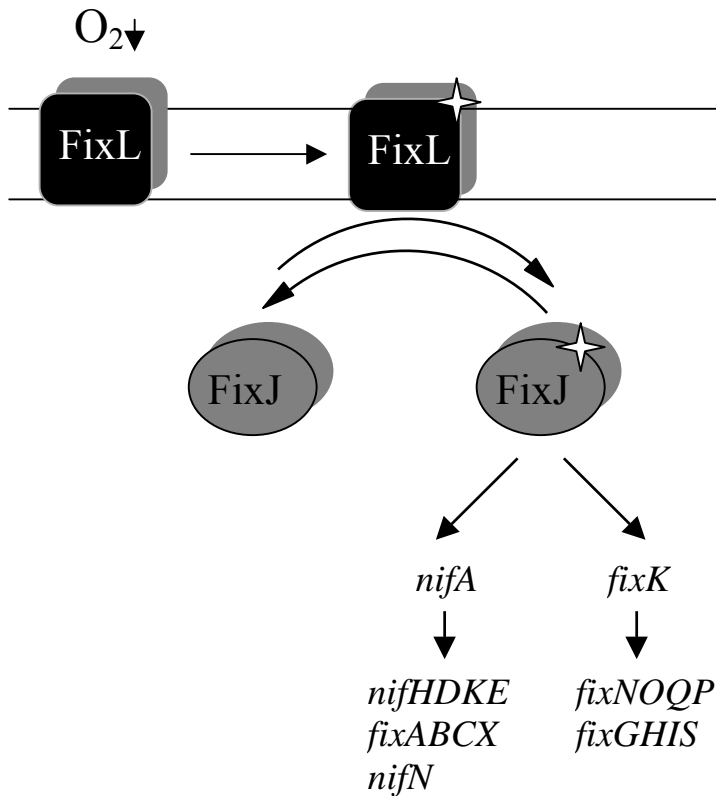
Az optimális körülmények között lejátszódó nitrogén redukciót az alábbi egyenlettel lehet leírni:



#### 2.4. A nitrogénkötésben szerepet játszó *nif/fix* gének szabályozása *S. meliloti*-ban

Szimbiotikus körülmények között, alacsony oxigénkoncentrációnál *S. meliloti*-ban a nitrogénkötésben szerepet játszó gének (*nif* és *fix*) indukálódnak. Aerob körülmények között csupán alacsony szinten, vagy egyáltalán nem fejeződnek ki. E gének kifejeződését egy regulációs kaszkád működése szabályozza (David és mtsai. 1988), melynek első két elemét a FixL/FixJ kétkomponensű jelátvivő rendszer képezi (1. ábra). *S. meliloti*-ban a FixL fehérje egy membránkötött, oxigén által regulált hemoprotein kináz/foszfátáz. Szerepe az oxigén szint érzékelése. Alacsony oxigénkoncentráció mellett autofoszforilálódik, majd a foszfátcsoportot átadja a szabályozó FixJ fehérjének (Gilles-Gonzalez és Gonzalez 1993). A FixJ ezáltal képes a *nifA* és *fixK* gének promóteréhez kapcsolódni és elindítani azok átíródását (David és mtsai. 1988). A NifA fehérje által aktivált *nif* és *fix* géneknek szerepük van a nitrogenáz enzimkomplex elemeinek szintézisében, valamint e komplex működéséhez szükséges fehérjéket kódolnak. A FixK fehérje által szabályozott *fixNOQP* operon a szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc terminális oxidázának az elemeit kódolja (Batut és mtsai. 1989, Preisig és mtsai. 1993), míg a *fixGHIS* operon által kódolt fehérjéknek e terminális oxidázhoz szükséges réz transzportjában van szerepük (Kahn és mtsai. 1989).

*Bradyrhizobium japonicum*-ban egy további jelátvivő rendszert írtak le Sciotti és mtsai.



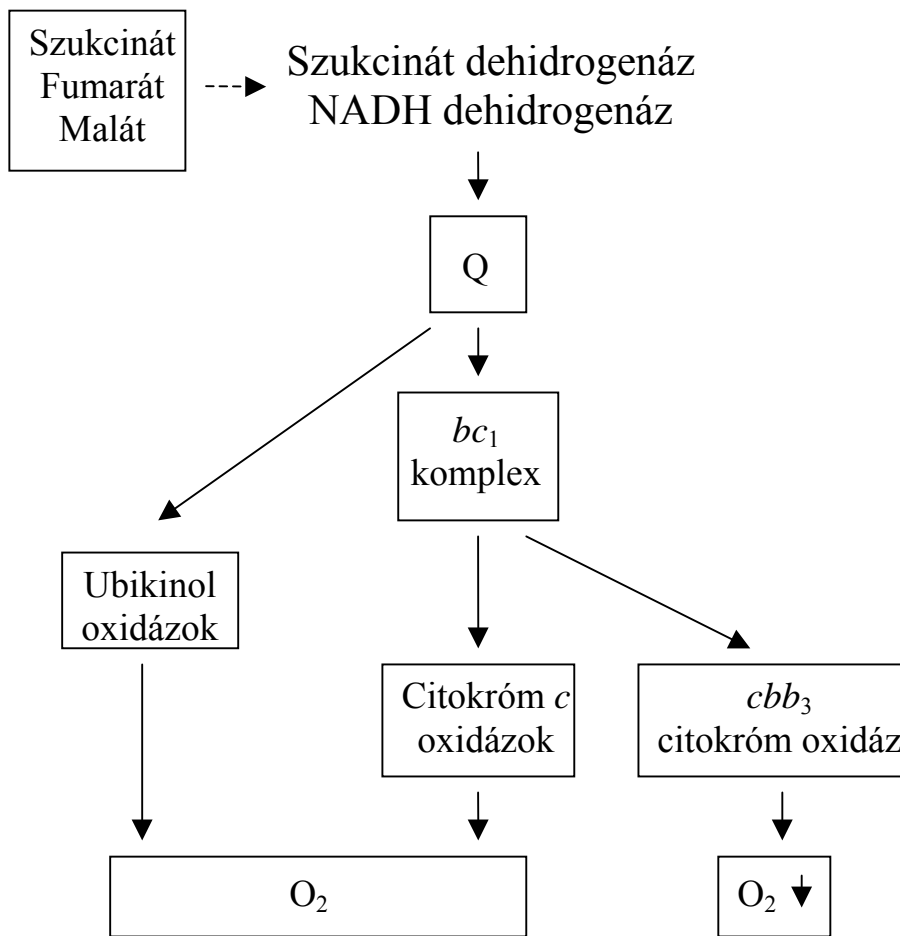
**1. ábra** A *nif/fix* géneket szabályozó regulációs kaszkád  
A csillagok a FixL és a FixJ fehérje foszforilált állapotát jelzik.

(2003), a RegS/RegR-t, mely a FixL/FixJ mellett résztvesz számos nitrogénkötésben szerepet játszó gén (pl. *nifH*, *nifDKENX*, *nifS*, *nifB*, *fixA*, *fixBCX* stb.) mikroaerob indukciójában. E kétkomponensű jelátvivő rendszer homológjai megtalálhatók *Rhodobacter capsulatus*-ban (RegB/A) (Masuda és mtsai. 1999), *Rhodobacter sphaeroides*-ben (PrrB/A) (Karls és mtsai. 1999), valamint *S. meliloti*-ban (ActS/R) (Tiwari és mtsai. 1996), ahol különböző szerepet betöltő gének kifejeződését szabályozzák. A RegB/A és PrrB/A rendszerek főleg a fotoszintézisben szerepet játszó génekre hatnak, az ActS/R pedig a formiát, a formaldehid, és a metanol dehidrogenázok szintézisét szabályozzák (Fenner és mtsai. 2000), valamint olyan gének kifejeződésére hatnak, melyek a baktériumok alacsony pH szintekhez való alkalmazkodását biztosítják (Tiwari és mtsai. 1996). A RegR, RegA, PrrA valamint az ActR regulátor fehérjék

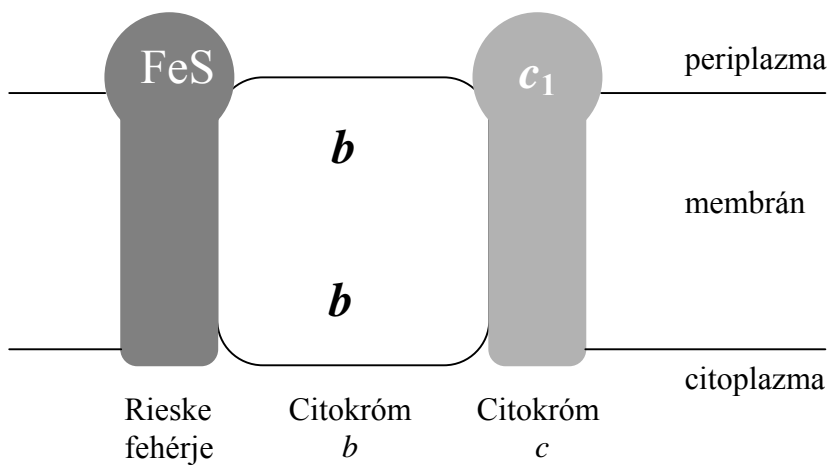
szerkezete is azonos (Bauer és mtsai. 1998, Masuda és mtsai. 1999), ami arra utal, hogy valószínűleg homológ DNS szekvenciákat ismernek fel.

## 2.5. Bakteriális elektrontranszport láncok

A diazotróf baktériumok energiatermelése teljes mértékben a respirációra épül, ahol a végső proton- és elektronakceptor az oxigén. A terminális oxidáció számára a gazdanövényből származó fotoszintézis termékek képezik az üzemanyagforrást. Ezek a citrát ciklus intermedier dikarbonsavai formájában jutnak el a DctA dikarbonsav-transzporterén keresztül a bakteroidokba (Jording és mtsai. 1994). Itt a különböző dehidrogenázok működése révén a szubsztrátokból protonok és elektronok keletkeznek, s végül a terminális oxidázokra kerülnek. Míg az eukarióták mitokondriumában egyetlen típusú légzési elektrontranszport lánc van, az aerob baktériumok a különböző oxigénkoncentrációkhoz való alkalmazkodásuk következtében elágazó légzési láncokkal rendelkeznek (2. ábra). A tápanyagokból a különböző dehidrogenázok működése során származó protonok és elektronok a citoplazma membrán kinonjaira (Q) kerülnek. Innen az elektronok közvetlenül vagy közvetve eljutnak a membránokba ágyazódó terminális oxidázokra. A baktériumokban kétféle, egymással homológiát mutató terminális oxidáz típust írtak le, az ubikinol-oxidázokat és a citokróm *c*-oxidázokat (Poole 1988). Az ubikinol oxidázok közvetlenül az ubikinoltól kapják az elektronokat, míg a citokróm *c*-oxidázok a  $bc_1$  komplex által redukált citokróm *c* fehérjétől. A  $bc_1$  komplex (más néven ubikinol: citokróm *c* oxidoreduktáz vagy III komplex) egy membránfehérje komplex, mely 3 alegységet és 4 redox központot tartalmaz (3. ábra). Az egyik alegysége, a Rieske FeS fehérje egy 2Fe-2S csoportot hordoz konzervált cisztein és hisztidin aminosavakhoz kapcsoltn. A citokróm *b* kilenc transzmembrán doménnel



2. ábra Az elágazó bakteriális légzési elektrontranszport láncok modellje



3. ábra A bakteriális  $bc_1$  komplex szerkezeti modellje

rendelkező membrán fehérje, mely két hemB prosztetikus csoportot tartalmaz. A  $c_1$  apoprotein C-terminális részével kötődik a citoplazma membránhoz, az N-terminális periplazmatikus szakaszán pedig kovalensen kapcsolódó C típusú hemet hordoz. A  $bc_1$  komplex központi szerepet tölt be a respirációs folyamatokban. A kinonokat oxidálja, és redukálja az elektronhordozó metalloproteineket, melyek legtöbb esetben  $c$ -típusú citokrómok. A fototróf baktériumokban a  $bc_1$  komplex a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokban is résztvesz.

A terminális oxidázok több alegységből épülnek fel. Az eukarióták terminális oxidázának tizenhárom alegységével szemben a baktériumokban a legtöbb oxidáz három alegységből áll (Delgado és mtsai. 1998). A citokróm  $c$  oxidázok és ubikinol oxidázok alegységeinek összetétele és szerkezete hasonló. Az ubikinol oxidázokkal szemben azonban a citokróm  $c$  oxidázok II alegységében található a két rézatomból álló úgynevezett  $Cu_A$  redox központ, melynek az a szerepe, hogy a  $c$ -típusú citokrómtól átvegye az elektronokat. Innen az elektronok az I alegység hem csoportjára, majd (minden oxidáz esetében) az ugyanezen alegység kétmagvú központjára jutnak. A kétmagvú központ egy  $Cu_B$ -t és egy hem csoportot tartalmaz, melyek négy konzervált hisztidin segítségével kapcsolódnak az oxidáz I alegységéhez. Az itt található hem csoportot ligandkötő hemnek vagy „magas spinű” hemnek nevezik, mivel az I alegységnek csupán egyetlen hisztidinjéhez kötődik, és így az oxigén számára marad egy szabad kötőhelye. A kétmagvú központban redukálódik vízzé az oxigén. Az I alegység másik hemje „alacsony spinű”, nincs párosítatlan elektronja és csupán az elektronok továbbításáért felelős. Az oxidázok elnevezése az I alegységhez kapcsolódó hem prosztetikus csoportok típusa alapján történik. Az A, B, D és O típusú hem csoportok szinte tetszőleges kombinációban ( $aa_3$ ,  $bb_3$ ,  $ba_3$ ,  $bo$ ,  $ao$  stb.) kapcsolódhatnak az oxidázhoz. A '3'-as jelzés a kétmagvú központban lévő magas spinű hemet jelzi az alegység másik, alacsony spinű hemjével szemben. Azokat a hem-réz oxidázokat, melyek

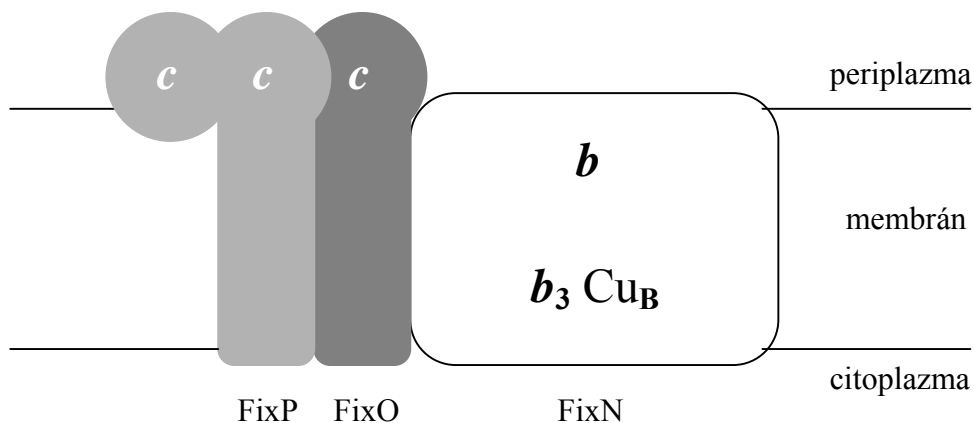


elektrononorként C típusú hemet használnak 'c' előjával szokták jelölni, mint például a *caa*<sub>3</sub> citokróm c oxidázt.

## 2.6. A szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc

Régóta fennálló hipotézis, hogy a *Rhizobium*-ok endoszimbiotikus formái a mikroaerob körülmények között történő energianyeréshez egy nagy oxigénaffinitású terminális oxidáz indukciójával alkalmazkodnak (Appleby 1984). Genetikai kísérletekkel *Bradyrhizobium japonicum*-ban bizonyították, hogy ha az ismert, aerob körülmények közt kimutatható c-típusú citokrómok struktúrgénjeiben mutációt hoztak létre, a mutáns baktériumok továbbra is képesek a légköri nitrogén redukciójára (Bott és mtsai. 1995, Rossbach és mtsai. 1991, Tully és mtsai. 1991). Ha azonban a Rieske vas-kén fehérjét és a citokróm *bc*<sub>1</sub> komplex struktúrfehérjéit kódoló *fbcFH* operonban következik be mutáció, a baktériumok bakteroiddá történő átalakulása is zavart szenved, és nem kötik a légköri nitrogént (Thöny-Meyer és mtsai. 1989). Ezen adatok alapján azt a következtetést vonták le, hogy az elektronok a bakteroidok *bc*<sub>1</sub> komplexén keresztül jutnak el egy szimbiózis-specifikus citokróm c oxidázra. 1993-ban Preisig és mtsai. azonosítottak egy szimbiotikus nitrogénkötés szempontjából nélkülözhetetlen géncsoportot *Bradyrhizobium japonicum*-ban, a *fixNOQP* operont, amely a többi nitrogénkötésben szerepet játszó génhez hasonlóan csupán alacsony O<sub>2</sub> koncentrációnál íródik át. A *fixNOQP* operonban mutáns baktériumok aerob körülmények között a vad baktériumokhoz hasonló fenotípust mutattak. Mikroaerob körülmények között azonban az izolált membránfehérje frakcióból két c-típusú citokróm hiányzott. A *fixNOQP* operont ezután számos baktérium fajban azonosították, mint például *S. meliloti*-ban (Preisig és mtsai. 1993), *Azorhizobium caulinodans*-ban (Mandon és mtsai. 1994), *Agrobacterium tumefaciens*-ben (Schlüter és mtsai. 1995) és *Rhizobium*

*leguminosarum*-ban (Schlüter és mtsai. 1997). A *fixNOQP* egy új citokróm *c*-t tartalmazó terminális oxidáz, a *cbb<sub>3</sub>*-at kódolja, mely a bakteroidokban nagy oxigénaffinitással működik, és ezáltal megfelelő energiát biztosít a nitrogénkötés számára. E terminális oxidázból hiányzik a hagyományos oxidázok II alegysége (4. ábra). A *fixN* gén által kódolt fehérje egy tipikus hem-réz oxidáz I alegységének felel meg. A fehérje 12 transzmembrán domént tartalmaz hat konzervált hisztidinnel, melyek a Cu<sub>B</sub> valamint két hemB (a magas- és az alacsony spinű) ligandjaiként szerepelnek (Delgado és mtsai. 1998). A FixO és FixP fehérjék mono- és dihem *c*-típusú citokrómok, melyek az N-terminális hidrofób részükkel a membránba ágyazódnak. A FixQ az eddigi adatok alapján még ismeretlen funkciójú kisméretű fehérje, mely N-terminális részével a citoplazma membránhoz kötődik. Biokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy az elektronoknak e komplexbe való belépési helye a FixP, ahonnan a másik citokróm *c*-n, a FixO-n keresztül jutnak el a FixN fehérjére, majd a molekuláris oxigénre.



**4. ábra** A bakteriális nagy oxigén-affinitású *cbb<sub>3</sub>* terminális oxidáz szerkezeti modellje

A baktériumok a fent említett terminális oxidázokon kívül számos olyan oxidoreduktázzal rendelkeznek, melyek más és más alternatív elektron akceptorokat használnak. Ilyen például a nitrát-reduktáz enzim, mely molibdént, valamint nem hem vasat tartalmaz és a szerves

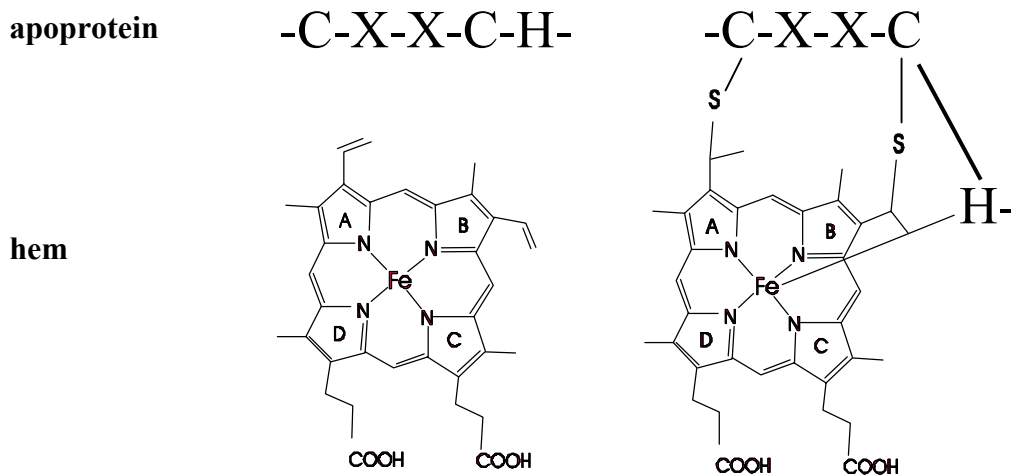
vegyületek elégetéséhez terminális elektron akceptorként nitrátot használ fel, a nitrát→nitrit átalakulást katalizálja. *Bradyrhizobium japonicum* esetében bizonyították, hogy a  $bc_1$  komplexet kódoló génekben mutáns baktériumok nitrát redukcióra képtelenek (Ritz és mtsai. 1995). Valószínű, hogy *S. meliloti*-ban is a  $bc_1$  komplex szintjén jön létre a leágazás az oxigénhez vezető elektrontranszport láncból. Az elektronoknak a  $bc_1$  komplexről a nitrát-reduktáz felé történő továbbszállításában *b*- és *c*-típusú citokrómok vesznek részt (Bott és mtsai. 1995).

Az elektronoknak a légzési láncokon való szállításához szorosan kapcsolódó folyamat a protonoknak a periplazmatikus térbe való kipumpálása. Ily módon proton elektrokémiai potenciálkülönbség jön létre, melyet protonmozgató erőnek neveznek. A protonmozgató erő a forrása az ATP szintézisnek, valamint az aktív transzportoknak. A periplazmába került protonoknak a citoplazmába való visszajutását és az ATP szintézisét az  $F_0F_1$ -ATP-áz katalizálja. 3 proton visszaáramlása a citoplazmába egy molekula ATP-nek ADP-ből és szervetlen foszfátból való szintéziséhez vezet (Mitchell 1991).

Az előzőekben láttuk, hogy a *c*-típusú citokrómoknak fontos szerepük van számos légzési elektrontranszport lánc működésében. *S. meliloti*-ban végzett kísérletek során Kereszt és mtsai. 1995-ben azonosították a *cycHJKL* operont, melynek funkciója nélkülözhetetlen az összes *c*-típusú citokróm biogenezéséhez. A *cyc* génekben mutációt hordozó baktériumok nem képesek a légköri nitrogént megkötni ( $Fix^-$ ), továbbá nitrát-reduktáz hiányos fenotípust mutattak ( $Rnr^-$ ). Mint kiderült, e fenotípus a szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport láncban lévő *c*-típusú citokrómok, valamint a nitrát-reduktáz enzimhez elektronokat szállító *c*-típusú citokrómok hiányának köszönhető.

## 2.7. A *c*-típusú citokrómok

A *c*-típusú citokrómok a citoplazma membránokban valamint a periplazmában elhelyezkedő elektronhordozók. Két komponensből, a *c*-típusú citokróm apoproteinből és a hem prosztetikus csoportból állnak. A többi citokrómtól eltérő tulajdonságuk az, hogy a hem csoport kovalens módon kapcsolódik az apoproteinhez. Az apoprotein egy vagy több CXXCH hemkötő motívumot tartalmaz (5. ábra). A B típusú hem két vinil csoportján keresztül diszulfid hidakkal kapcsolódik az apoprotein hemkötő doménjének két ciszteinjéhez, így jön létre a C típusú hem. A hemkötő motívum hisztidinje pedig a hem központi vas atomját koordinálja.

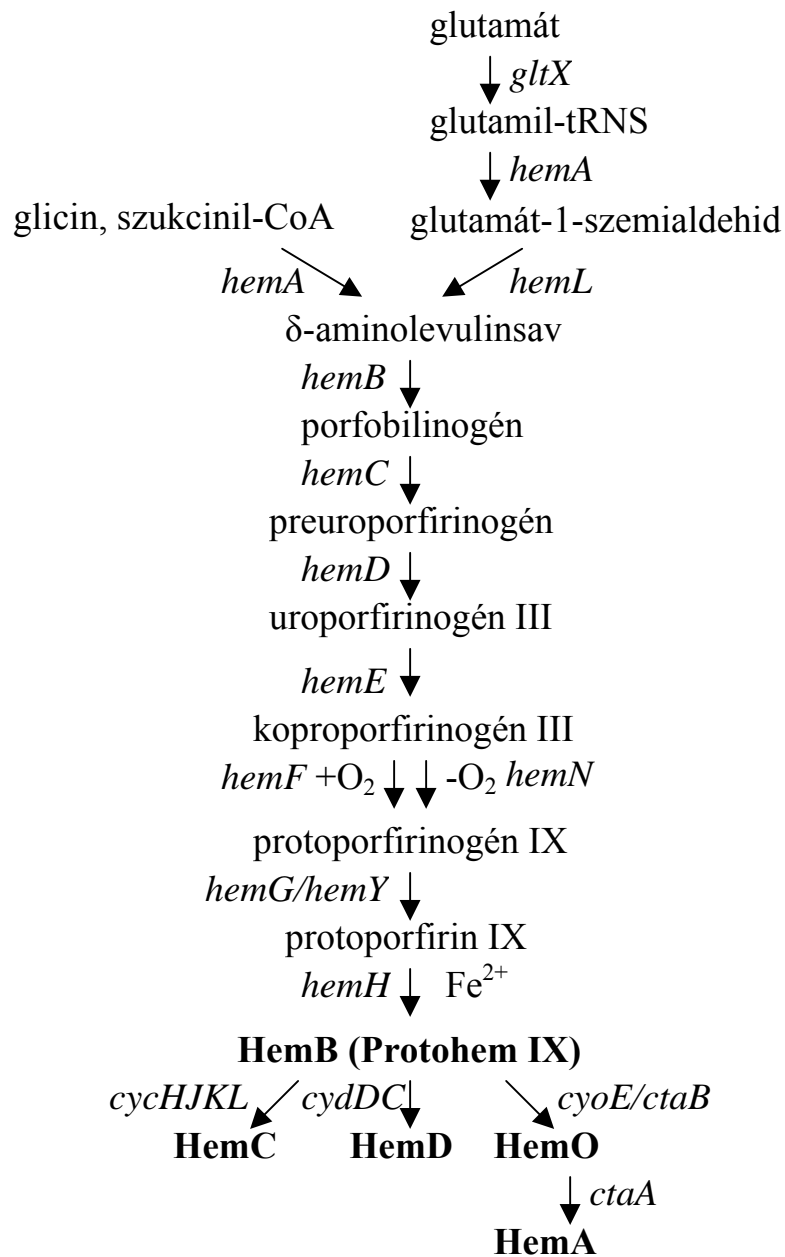


5. ábra Az apoprotein és a hem prosztetikus csoport közti kötések kialakulása

A *c*-típusú citokrómok mindkét komponense a citoplazmában szintetizálódik. Ezt követően a citoplazma membránon keresztül külön-külön átjutnak a periplazmába, ahol kovalensen kapcsolódnak, és létrehozzák a működőképes *c*-típusú citokrómokat, melyek beépülnek a membránba, vagy a periplazmában szolubilis citokrómként töltik be szerepüket. A citoplazmában szintetizálódó pre-apoproteinek N-terminális részükön szignál szekvenciát

hordoznak. Ezt ismerik fel a Sec fehérjék, melyek segítségével az apoproteinek transzportja megtörténik a membránon keresztül a periplazmába. Itt a szolubilis apoproteinekról a *lepB* gén által kódolt szekréciós szignál peptidáz eltávolítja a szignál szekvenciát (Dalbey és von Heijne 1992). Bizonyították, hogy *Escherichia coli*-ban a *c<sub>550</sub>* apoproteinre a hem csoport csupán a szignál szekvencia eltávolítását követően képes rákötödni (Sambongi és mtsai. 1996). A membránkötött *c*-típusú citokróm apoproteinek szignál szekvenciája azonban nem hasad le, és feltételezhetően a membránban való lokalizációhoz szükséges.

A hem proszтетikus csoport bioszintézise számos lépést foglal magába (6. ábra). A hem első prekursora, a  $\delta$ -aminolevulinsav, a különböző baktériumokban kétféleképpen jöhet létre. *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Agrobacterium* fajoknál glicinből és szukcinil CoA-ból, a *hemA* gén által kódolt  $\delta$ -aminolevulinsav szintáz segítségével keletkezik. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* és cianobaktériumok esetében pedig a glutamát képezi a kiinduló forrást. Ezt követően számos biokémiai átalakulás eredményeként jön létre a hem közvetlen prekursora, a protoporfirin IX (PPIX), melyet a hem porfirin váza alkot. A következő lépésben a *hemH* gén által kódolt ferrokelatáz enzim beépíti a redukált Fe atomot a porfirin vázba, és létrejön a hem B (protohem IX) (Thöny-Meyer 1997). Dailey és mtsai. (2000) adatai alapján a ferrokelatáz enzim a különböző baktériumokban a citoplazmában található, vagy pedig a membrán citoplazmatikus oldalán membránhoz kötötten helyezkedik el. A keletkezett hem rendkívül hidrofób molekula, mely könnyen lép kapcsolatba a membránokkal, azonban nehezen jut át rajtuk. Jelenlegi adatok alapján nem áll rendelkezésünkre olyan információ, mely a hem csoportnak a citoplazmából a periplazmába való átjutási módját igazolná. Feltételezik, hogy *Escherichia coli*-ban passzív diffúzióval, vagy a CcmC membránfehérje segítségével történik a hem transzportja (Thöny-Meyer 2002). *Rhodobacter capsulatus*-ban a HelABC (Goldman és mtsai. 1997),



**6. ábra** A hem bioszintézis vázlatos ábrázolása  
Az egyes funkciókért felelős gének a nyilak mellett vannak feltüntetve. A keletkezett hem termékeket félkövér betűk jelölik.

*Bradyrhizobium japonicum*-ban pedig a CycVWZ (Ramseier és mtsai. 1991) fehérjékről feltételezik, hogy segítik a hem periplazmába való átjutását.

## 2.8. A citokróm *c* hem liáz komplex

Miután a *c*-típusú citokrómok két komponense a periplazmába került, megtörténik az összekapcsolásuk. *S. meliloti*-ban a *cycHJKL* operon által kódolt fehérjék felelősek azért, hogy az összes *c*-típusú citokróm két alkotórésze összeszerelődjön (Kereszt és mtsai. 1995). A CycH, CycJ, CycK és CycL fehérjék együttesen egy hem liáz komplexet alkotnak, és ha bármelyikük mutáció következtében hiányzik a komplexből, a baktériumok nem képesek *c*-típusú citokrómokat termelni. A *S. meliloti cycHJKL* génjeinek homológjait számos más baktérium fajban is megtalálták. Így például: *Rhizobium leguminosarum*-ban (Delgado és mtsai. 1995) és *Bradyrhizobium japonicum*-ban (Ritz és mtsai. 1995) azonosították a *cycHJKL* operont, *Rhizobium etli*-ben a *ccmIEFH* operont (Reyes és mtsai. 2000), *Rhodobacter capsulatus*-ban a *cycH*, *ccl12* és *cycJ* géneket (Lang és mtsai. 1996, Gabblert és mtsai. 1997, Deshmukh és mtsai. 2000), *Paracoccus denitrificans*-ban a *ccmFH* géneket (Pearce és mtsai. 1998), valamint *Escherichia coli*-ban a *ccmH* és *ccmEF* géneket (Grove és mtsai. 1996) (1. táblázat). A *Paracoccus denitrificans*-ban és *Escherichia coli*-ban képződő CcmH olyan fúziós fehérje, melynek N-terminális része homológ a *S. meliloti* CycH N-terminálisával, C-terminális része pedig homológ a *S. meliloti* CycL fehérjével. Különböző kutatási eredmények alapján számos közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatást mutattak ki a hem liáz komplex alegységei között (Ren és mtsai. 2002). A komplex működése azonban még nem teljesen ismert.

A *cycH* gén által kódolt fehérje két transzmembrán doménnel rendelkezik, melyeket egy citoplazmatikus hurok kapcsol össze (lásd később), a fehérje C-terminális kétharmada pedig a periplazmába nyúlik. A CycH feltételezett szerepe az, hogy a *c*-típusú citokróm apoproteint megfelelő konformációban tartsa a hemmel való kovalens kötés kialakítása közben (Ritz és mtsai. 1993, Page és Ferguson 1995, Lang és mtsai. 1996). Kimutatták, hogy a fehérje funkcionálisan

**1. táblázat** A *S. meliloti* *cyc* génjeinek homológjai különböző fajokban

<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>cycH</i>	<i>cycJ</i>	<i>cycK</i>	<i>cycL</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>cycH</i>	<i>cycJ</i>	<i>cycK</i>	<i>cycL</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>cycH</i>	<i>cycJ</i>	<i>cycK</i>	<i>cycL</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>ccmI</i>	<i>ccmE</i>	<i>ccmF</i>	<i>ccmH</i>
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>cycH</i>	<i>cycJ</i>	<i>cclI</i>	<i>ccl2</i>
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>ccmH</i>		<i>ccmF</i>	<i>ccmH</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>ccmH</i>	<i>ccmE</i>	<i>ccmF</i>	<i>ccmH</i>

két részre különíthető el. Ha a fehérje N-terminális részét eltávolították, az összes ismert *c*-típusú citokróm hiányzott a *Rhodobacter capsulatus*, *Bradyrhizobium japonicum* és *Rhizobium etli* baktériumokból, azonban ha a fehérje C-terminális régiója hiányzott, *c*<sub>1</sub> citokróm mindig szintetizálódott (Lang és mtsai. 1996, Ritz és mtsai. 1993, Reyes és mtsai. 2000). A CycJ fehérje N-terminális része membránhoz kötött, C-terminális szakasza pedig a periplazmába nyúlik. A CycJ-vel homológ fehérje elnevezése *Escherichia coli*-ban CcmE. A CcmE fehérjéről bizonyították, hogy a periplazmatikus szakasz 130-as helyzetű hisztidinje kovalensen köti a hemet (Enggist és mtsai. 2003), tehát a periplazmatikus hem transzportban játszik szerepet. Ez a konzervált hisztidin aminosav a *Sinorhizobium meliloti* CycJ fehérjében is jelen van. A CcmE és CcmF (CycK homológ) fehérjék között *Escherichia coli*-ban közvetlen kölcsönhatást mutattak ki (Ren és mtsai. 2002). A CycK fehérje *S. meliloti*-ban 12 transzmembrán doménnel rendelkezik, és a WGGWWFWD erősen konzervált, triptofánban gazdag szakaszt hordozza, mely a CycK összes homológjában jelen van. Feltételezett szerepe a hem csoport megkötése (Thöny-Meyer és mtsai. 1994). A CycL fehérje C-terminális végével membránhoz kötött, N-terminális szakaszán pedig, mely a periplazmába nyúlik, az LRCMVCQ konzervált motívum található. *Rhodobacter capsulatus*-ban a Ccl2 (CycL homológ) fehérjéről kimutatták, hogy e motívum mindkét ciszteinje



nélkülözhetetlen szerepet tölt be a fehérje funkciójában, ugyanis az apoprotein hemkötő doménjének ciszteinjeit redukálja, és ezáltal biztosítja a hem csoport apoproteinhez való kapcsolódását (Monika és mtsai. 1997). A fentiekben említett négy fehérje alkotja a citokróm *c* hem liáz komplexet, mely működése során *c*-típusú citokrómokat hoz létre. Jelenleg számos laboratóriumban folynak a kutatások, hogy kiderítsék a citokróm *c* hem liáz komplex alegységeinek pontos funkcióját.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban ismertetett munka megkezdésekor célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *S. meliloti* citokróom *c* hem liáz komplexet képező Cyc fehérjéknek a *c*-típusú citokróomok biogenezisében betöltött funkcióját. Mivel feltételeztük, hogy a Cyc fehérjéket kódoló *cycHJKL* operon transzkripciójának szintjét a szimbiózisra jellemző mikroaerob körülmények befolyásolhatják, összehasonlítottuk a *cyc* operon átíródását aerob és mikroaerob körülmények között.

Céljainkat különböző genetikai és biokémiai vizsgálatok segítségével akartuk elérni. Ehhez a következő részfeladatok megoldása útján kívántunk eljutni:

-A vad típusú és *cyc* génekben mutáns baktériumok hem bioszintézise közötti különbségek detektálása biokémiai és spektrofluorimetriai módszerekkel.

-A vad típusra jellemző, alacsony protoporfirin IX (PPIX) szint megőrzéséhez elegendő legrövidebb N-terminális Cych fehérje szakasz azonosítása komplementációs kísérletekkel.

-A Cych fehérje C-terminális periplazmatikus szakaszának funkciójára rávilágító domének keresése.

-A *cycHJKL* operon transzkripciójának mikroaerob indukcióját kiváltó szabályozó fehérjék kimutatása biokémiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Baktérium törzsek és tenyésztési körülmények

A munkánk során felhasznált baktérium törzseket, valamint ezek fontosabb jellemzőit a 2. táblázatban soroltuk fel.

#### 2. táblázat Baktérium törzsek és plazmidok

Törzsek, plazmidok	Leírás	Hivatkozás, eredet
<b>Törzsek</b>		
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Maniatis és mtsai. 1982
<i>S. meliloti</i>		
AK631	vad típus, <i>S. meliloti</i> 41 származék	Bánfalvi és mtsai. 1981
AT342	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>cycH::Tn5</i> [56]	Kereszt és mtsai. 1995
PP2982	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>cycH::Tn5</i> [53]	Putnoky Péter
AT344	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>cycJ::Tn5</i> [52]	Kereszt és mtsai. 1995
AT345	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>cycK::Tn5</i> [87]	Kereszt és mtsai. 1995
GMI211	Sm <sup>r</sup> , vad típus, <i>S. meliloti</i> 2011	Niel és mtsai. 1977
GMI708	Sm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup> , vad típus, <i>S. meliloti</i> 2011 származék	Batut és mtsai. 1985
GMI5704	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>fixJ::Tn5</i> , GMI211 származék	David és mtsai. 1988
GMI5705	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>fixL::Tn5</i> , GMI211 származék	David és mtsai. 1988
GMI5630	Sm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , <i>fixK</i> mutáns, GMI708 származék	Batut és mtsai. 1989
GC351	Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>actR::Km</i> , GMI211 származék	Jelen munka

<b>Plazmidok</b>		
pBluescript (SK+)	Amp <sup>r</sup> , fl (+) <i>ori</i>	Alting-Mees és Short 1989
pPP381	<i>S. meliloti fix-14</i> régiót hordozó kozmid klón	Kereszt és mtsai. 1995
pEP82	Tet <sup>r</sup> , széles gazdaspecificitású, kis kópiaszámú RK2 származék	Élő és mtsai. 1998
pGC248	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a <i>cycH</i> génnek a Tn5[53] inszerció előtti régiója, 750 bp PCR szakaszon (CP5, P55 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC269	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a <i>cycH</i> génnek a <i>Sal</i> I restrikciós helyig terjedő szakasza	Cinege és mtsai. 2004
pGC274	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a <i>cycH</i> génnek a periplazmatikus régiót kódoló szakasza előtti része, 663 bp PCR fragmentumon (CP5, C60 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC280	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a <i>cycH</i> génnek a Tn5[56] inszerció előtti régiója, 493 bp PCR szakaszon (CP5, C58 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC281	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a <i>cycH</i> génnek a második transzmembrán régiót kódoló rész előtti szakasza, 589 bp PCR fragmentumon (CP5, C59 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC292	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Bgl</i> III helyén a teljes <i>cycH</i> gén, 1457 bp PCR szakaszon (CP5, C64 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC331	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I helyén a teljes <i>cycH</i> gén, és a <i>cycJ</i> egyrésze, 1670 bp PCR szakaszon (CP5, CYCJ2 primerek)	Cinege és mtsai. 2004
pGC332	Tet <sup>r</sup> , a pEP82 <i>Hind</i> III- <i>Pst</i> I helyén a <i>cycH</i> génnek a <i>Sal</i> I restrikciós helyig terjedő szakasza, és a <i>cycJ</i> gén	Cinege és mtsai. 2004
pAT522	Tet <sup>r</sup> , <i>cycH-lacZ</i> fúziót hordozó plazmid, pEP82 vektorban	Kereszt Attila
pAT523	Tet <sup>r</sup> , <i>cycK-lacZ</i> fúziót hordozó plazmid, pEP82	Cinege és mtsai. 2004

---

	vektorban	
pGC306	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> gén a harmadik TPR domén nélkül	Cinege és mtsai. 2004
pGC333	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> gén az első TPR domén nélkül	Cinege és mtsai. 2004
pGC335	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> gén a második TPR domén nélkül	Cinege és mtsai. 2004
pGC334	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> az első TPR domén nélkül, és a <i>cycJ</i> gén	Cinege és mtsai. 2004
pGC336	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> a második TPR domén nélkül, és a <i>cycJ</i> gén	Cinege és mtsai. 2004
pGC310	Tet <sup>r</sup> , pEP82-ben a <i>cycH</i> a harmadik TPR domén nélkül, és a <i>cycJ</i> gén	Cinege és mtsai. 2004
pRK290	Tet <sup>r</sup> , széles gazdaspecificitású, kis kópiaszámú RK2 származék, IncP	Ditta és mtsai. 1980
pGC348	Km <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , <i>actR::Km<sup>r</sup></i> kazetta, a pRK290-ben	Jelen munka
pXLGD4	Tet <sup>r</sup> , <i>hemA-lacZ</i> fúziót hordozó plazmid	Leong és mtsai. 1985
pRK2013	Km <sup>r</sup> , helper plazmid, RK2 transzfer génekkel	Ditta és mtsai. 1980
pPH1JI	Gm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Mob <sup>+</sup> , IncP	Hirsch és Beringer 1984

---

Az *Escherichia coli* törzseket LB komplett táptalajban (Maniatis és mtsai. 1982) 37 C°-on növesztettük. Ahol szükséges volt, a következő antibiotikum koncentrációkat használtuk: kanamicin 50 µg/ml, tetraciklin 10 µg/ml, ampicillin 100 µg/ml, gentamicin 10 µg/ml. A *Sinorhizobium meliloti* törzseket TA komplett (Kondorosi és mtsai. 1984) és GTS minimál (Kiss és mtsai. 1979) táptalajokban tenyésztettük 31 C°-on. Ez esetben az antibiotikumokat a következő koncentrációkban használtuk: kanamicin 200 µg/ml, tetraciklin 15 µg/ml, streptomycin 200 µg/ml és gentamicin 200 µg/ml. Alacsony oxigén koncentrációnál (mikroaerob körülmények között) történő mérésekhez először a 0,2, illetve β-galaktozidáz aktivitás mérések esetében 0,5 optikai denzitásig (600 nm-nél) növesztett baktérium tenyészeteket tartalmazó lombikokat suba-seal

(Sigma) dugók segítségével légmentesen lezártuk, majd rázatás közben 20 percen át nitrogén gázzal átbuborékolattuk. Ezt követően annyi levegőt juttattunk a tenyészetekbe, hogy ott az oxigénkoncentráció 6  $\mu\text{M}$  legyen. Az így létrehozott mikroaerob tenyészeteket 4 óra további növesztés után használtuk fel fehérje izoláláshoz, protoporfirin IX koncentráció meghatározáshoz, valamint  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás méréshez.

#### **4.2. Rekombináns DNS technikák és szekvencia analízis**

A pRK290 plazmid származékait *E. coli*-ből *S. meliloti*-ba konjugációval juttatuk be. Mivel a pRK290 plazmid transzferéhez szükséges a helper funkciókat hordozó pRK2013 plazmid jelenléte, triparentális keresztezéssel vittük át a recipiens sejtekbe (Ditta és mtsai. 1980). A plazmid DNS preparálást, restrikciós enzimekkel való emésztést, agaróz gél elektroforézist, DNS fragmentum izolálást, klónozási technikákat és az *E. coli* sejtek transzformálását Maniatis és mtsai. 1982 szerint végeztük. A Tn5 transzpozon inszerció helyét a PP2982 mutáns törzsben a P55 Tn5 specifikus oligonukleotida primer segítségével (3. táblázat) határoztuk meg. A DNS mintákat Applied biosystems ABI PRISM készülékkel szekvenáltattuk. A CycH fehérje homológia vizsgálatát az NCBI Conserved Domain Search, RPS Blast programmal végeztük.

#### **4.3. Plazmidok előállítása**

A felhasznált plazmidokat a 2. táblázatban soroltuk fel. A pAT522 (*cycH-lacZ*) és pAT523 (*cycK-lacZ*) fúziók, a *cyc* operon promóter aktivitásának meghatározása céljából (Kereszt Attila munkája) a következőképpen készültek: a pPP381 plazmidból a *cycHJKL* operont hordozó 6 kb *EcoRI* fragmentumot beépítettük a pUC19 vektorba. A *cyc* promóter előtti *XhoI* fragmentum helyére beépítettük a p34E-Tp-ből a trimetoprim rezisztencia gént (De Shazer és mtsai. 1996). E

klónból a *PstI*-*Bam*HI fragmentumot, mely a  $Tp^f$  gént, a *cyc* promótert és a *cycH* gén első 16 bp-ját hordozza, bevittük a pEP82 plazmidba a *lacZ* riporter gén elé, így létrehozva a pAT522 konstrukciót. A pAT523 plazmid elkészítéséhez egy hosszabb fragmentumot, a *PstI*-*PstI* szakaszt építettük be a pEP82-be, mely a  $Tp^f$  génen és *cyc* promóteren kívül a teljes *cycH*, *cycJ* gént, valamint a *cycK* gén egy részét tartalmazta.

A *cycH* gént, valamint annak deléciós származékait hordozó plazmidokat a 3. táblázatban bemutatott oligonukleotida primerek segítségével állítottuk elő. A polimeráz láncreakcióval

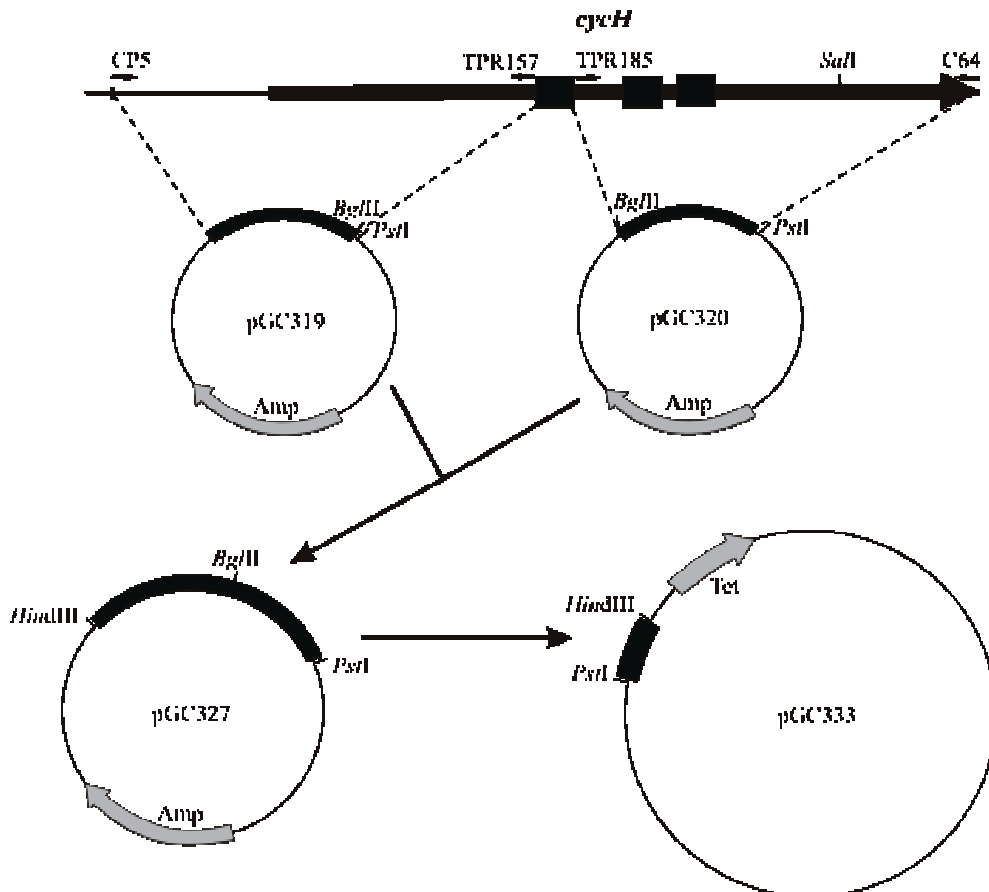
### 3. táblázat A kísérletekben használt oligonukleotida primerek

A primereken található *Bam*HI és *Bgl*III restrikciós enzim hasító helyeket félkövér betűkkel jelöltük.

Primer	Szekvencia (5'-3')
ACTR1	CCATTCCTGCTTCCAGGCGACATA
ACTR2	<b>GGAT</b> CCCCGGCTTCGCGGTCGAGAT
ACTR3	<b>GGAT</b> CCCCGTGTCGTCATCGACGAT
ACTR4	CCGGGTTTCGGCATAAAGTCCGGTA
C58	TGGCCAGCTCGGCTTCCTCG
C59	GCGCCAGGCGGTTGGATAGA
C60	TAGAGACAAAGGCCGACAGC
C64	CCTTTTCTGCTTGCGTGTCAATCA
CP5	CCCTATCAGGTCGGGTCGCA
CYCJ1	<b>AGATCT</b> GCGGAGAGGCTGAATGAC
CYCJ2	ATCCGTGACCGTGAAGGTGATGGT
CYCK1	TGGAGGTCAGCAGGACGAAGAACG
P55	GCAAAACGGGAAAGGTTCCG
SAL1	<b>AGATCT</b> AGGCTGTCGACCATGCCG
TPR224	<b>AGATCT</b> GATCATCGGGGTCGAGGG
TPR249	<b>AGATCT</b> TCCGCAAGCTCGCAGAGA
TPR157	<b>AGATCT</b> CCCAGCCGGCACCGTCTT
TPR185	<b>AGATCT</b> TCGGGCCAACCCCGGCAA
TPR208	<b>AGATCT</b> CGGCTGTGACCAGACCGC
TPR226	<b>AGATCT</b> CACCGTCCGCATTCTACC

(PCR) amplifikált megfelelő DNS szakaszokat egyes esetekben előbb pBluescript plazmidba építettük, majd minden esetben pEP82 mobilizálható plazmidba vittük be. A PCR reakciókhoz templátként a pAT523 plazmidot használtuk. A CychH fehérje szerepének a vizsgálatára használt pGC248, pGC269, pGC274, pGC280, pGC281, pGC292 és pGC331 plazmidok elkészítési módja a 2. táblázatban megtalálható. A pGC332 plazmid elkészítéséhez a CP5-SALI primer

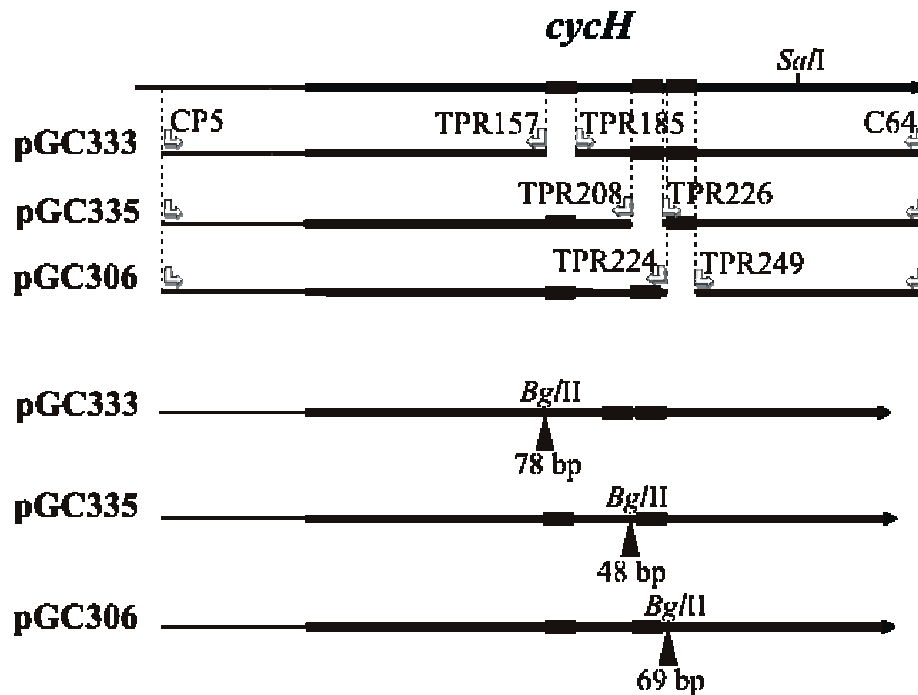
párral a *cycH* gén 5' 935 bp szakaszát amplifikáltuk, majd beépítettük a pBluescript *EcoRV* helyére. A CYCJ1-CYCK1 primer párt használva a *cycJ* gént is amplifikáltuk egy 890 bp szakaszon, majd az előző konstrukció *BglIII-PstI* helyére építettük. Az így keletkezett plazmid 2150 bp hosszúságú *HindIII-PstI* fragmentumát a csonka *cycH*, valamint a mögé fázisban épített teljes *cycJ* génnel beépítettük a pEP82 mobilizálható plazmid *HindIII-PstI* helyére, létrehozva a pGC332 plazmidot. A CycH fehérje tetratrikopeptid (TPR) doménjei szerepének a tanulmányozására szolgáló pGC333 plazmidot a CP5-TPR157 és TPR185-C64 primer párok segítségével készítettük el (7. és 8. ábra). E primerekkel a *cycH* gént amplifikáltuk az első TPR



**7. ábra** A *cycH* génben levő első TPR domént kódoló szakasz delécióját hordozó pGC333 konstrukció elkészítési modellje  
A fekete téglalapok jelzik a TPR doméneket kódoló szekvenciákat. A *cycH* gén fölött elhelyezett kis nyilak jelzik a PCR reakciókhoz használt oligonukleotida primereket.



domént kódoló része előtti és mögötti szakaszon. E szakaszoknak az első TPR domén felőli végén a primerekkel egy-egy *Bgl*II restrikciós enzim hasító helyet állítottunk elő. Az így kapott két DNS szakaszt külön-külön beépítettük a pBluescript *Eco*RV helyére. A *Bgl*II restrikciós helyeket használva a kapott két *cycH* fragmentumot ligáltuk. Az így létrejött *cycH* gén egy 78 bp-os, fázisban levő delécióit tartalmazott. Ezáltal egy olyan CycH fehérje képződött, melyből hiányzott a 157. és 185. aminosavak közötti szakasz az első TPR doménnel. Ahhoz, hogy az így létrejött konstrukciót bevigyük *S. meliloti*-ba, a plazmid 1342 bp *Hind*III-*Pst*I szakaszát beépítettük a pEP82 mobilizálható plazmid *Hind*III-*Pst*I helyére. A pGC335 plazmid elkészítése a pGC333-éhoz hasonló módon történt, ez esetben a CP5-TPR208 és TPR226-C64 primer párokat használtuk (8. ábra). Ily módon a *cycH* génben egy 48 bp-os, fázisban lévő delécióit hoztunk létre, így a kódolt fehérjéből hiányzott a 208. és 226. aminosavak közötti, második TPR

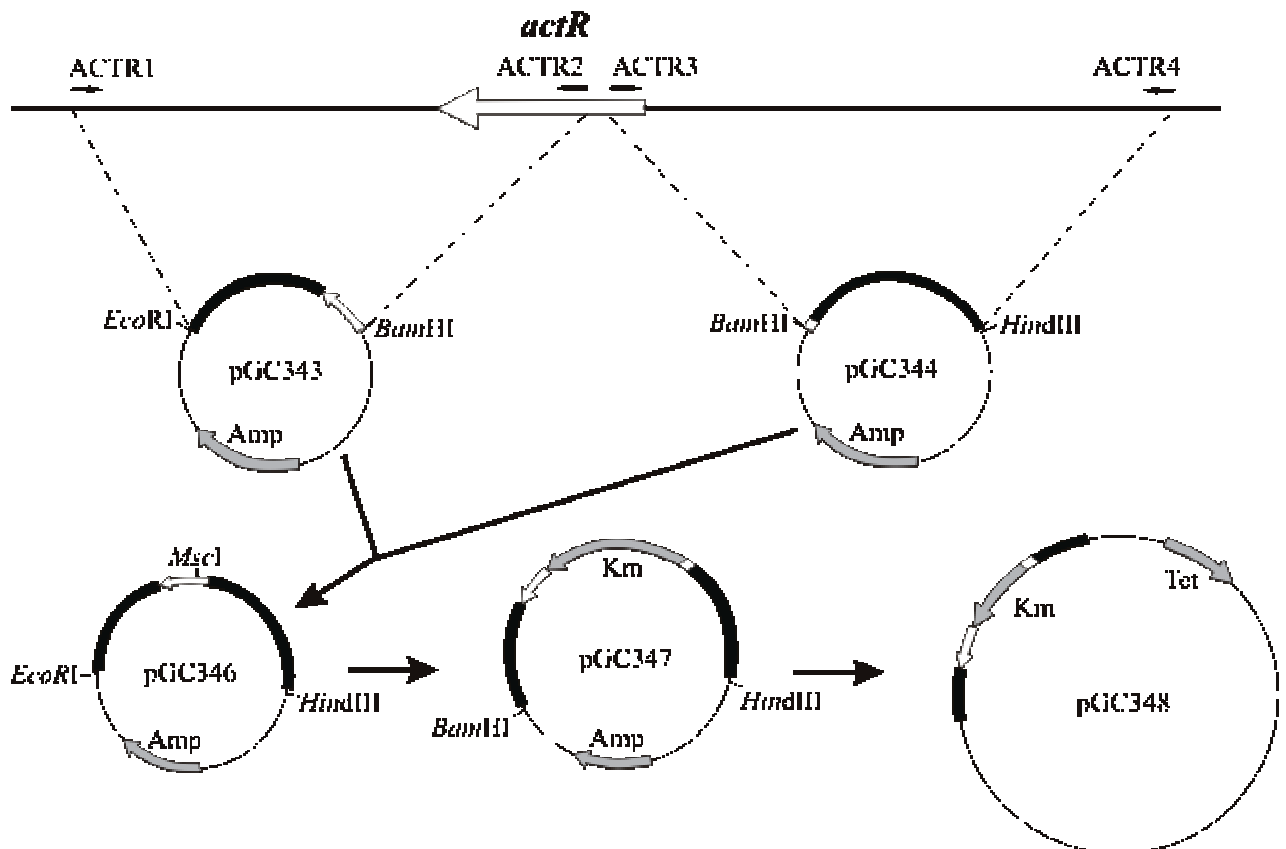


**8. ábra** A *cycH* génben levő TPR doméneket kódoló szakaszok delécióit hordozó plazmidok elkészítése

A fekete téglalapok jelzik a TPR doméneket kódoló szekvenciákat. A fehér nyilak jelzik az oligonukleotida primereket, melyeket a PCR reakciókhoz használtunk.

domént tartalmazó szakasz. A pGC306 plazmidot hasonló módon, a CP5-TPR224 és TPR249-C64 primer párokkal készítettük el. A keletkezett *cycH* gén egy olyan fehérjét kódolt, melyből hiányzott a harmadik TPR domén (24 aminosav a 224. és 249. aminosavak közt) (8. ábra). Ezt követően a pGC334, pGC336 illetve a pGC310 plazmidokat készítettük el a pGC333, pGC335 és pGC306 konstrukciók segítségével úgy, hogy a *cycH*-ban található TPR deléciók mögé a *SalI* helyre fázisban beépítettük a pAT523-ból izolált 1153 bp *SalI-PstI* fragmentumot, mely az eltávolított *cycH* génszakasz mellett a teljes *cycJ* gént is tartalmazta.

Az *actR* génben mutáns *S. meliloti* törzs előállításának céljából a pGC348 plazmidot az alábbiak alapján készítettük el (9. ábra). Az *actR* gént és a körülötte levő régiót az ACTR1-ACTR2 és ACTR3-ACTR4 primer párok segítségével PCR reakciókkal amplifikáltuk. Az így



**9. ábra** Az *actR* mutáns gént hordozó pGC348 konstrukció elkészítésének modellje. Az *actR* gén és körülötte levő régió fölött kis nyilakkal jelölve feltüntettük a PCR reakciókhoz használt oligonukleotida primereket.

kapott 1612 bp és 1664 bp fragmentumokat külön-külön beépítettük a pBluescript *Sma*I helyére. A keletkezett pGC343 és pGC344 konstrukciókat előbb *Bam*HI restrikciós enzimmel emésztettük és feltöltöttük a DNS végeket, majd *Eco*RI-gyel illetve *Hind*III-mal való emésztés után izoláltuk az adott fragmentumokat és beépítettük a pBluescript *Eco*RI-*Hind*III helyére. Az így létrejött konstrukcióban található *actR* gén egyetlen *Msc*I restrikciós hasító helyére beépítettük a Tn5 transzpozon 1463 bp *Hind*III/*Sal*I fragmentumát a Km rezisztencia marker génnel abból a célból, hogy a genomba kettős homológ rekombinációval való bevitelre szelektálni tudjunk. A kapott konstrukcióból (pGC347) kivágtuk a 4781 bp *Bam*HI/*Hind*III fragmentumot a Km<sup>r</sup> inszerciót hordozó *actR* génnel és a körülötte levő régióval, majd beépítettük a pRK290 *Eco*RI helyére, így létrehozva a pGC348 plazmidot, amely már mobilizálható és replikálódik *S. meliloti*-ban.

#### 4.4. Mutáns *S. meliloti* törzsek előállítás

A PP2982 törzset csoportunkban a Kereszt és mtsai. 1995-ben leírt, *cyc* génekben mutáns törzsekhez hasonlóan állították elő célzott Tn5 mutagenézissel.

Az *actR* génben mutáns GC351 törzset az alábbiak szerint készítettük el. A pGC348 plazmidot konjugációval bevittük a vad típusú *S. meliloti* GMI211 törzsbe. A plazmidon található *actR* génben levő Km<sup>r</sup> markernek a kromoszómális *actR* génkópiába kettős homológ rekombinációval való beépülésére úgy szelektáltunk, hogy a *S. meliloti*-ban lévő pGC348 plazmidot kiűztük a vele inkompatibilis pPH1JI plazmiddal, közben Gm és Km rezisztenciára szelektáltunk. A Gm<sup>r</sup> a pPH1JI markere. Amint azt Southern-analízissel bizonyítottuk, a kapott Tet (pRK290 plazmid markere) szenzitív klónok a genomban tartalmazták a Km<sup>r</sup> kazettát.

#### **4.5. A c-típusú citokrómok és a protoporfirin IX kimutatása**

*S. meliloti* baktériumokból fehérje kivonatot készítettünk, majd centrifugálással elválasztottuk a membránkötött és szolubilis fehérje frakciókat Kereszt és mtsai. (1995) módszere alapján. 300 µg fehérjét tartalmazó kivonatot denaturálás után 15%-os SDS poliakrilamid gélen elektroforézissel szétválasztottunk (Laemmli és mtsai. 1970), majd kovalensen kötött hemet tartalmazó c-típusú citokrómok specifikus kimutatására alkalmas módszerrel festettünk (Schulz és mtsai. 2000). A módszer azon alapul, hogy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és oxidálható szubsztrát, például valamilyen benzidin származék jelenlétében a hem csoport peroxidáz aktivitást mutat, és az oxidálódott hidrogéndonor, esetünkben az orto-dianizidin (Sigma D-9154), színes, vízben oldhatatlan csapadékként kiválik a gélben. Elektroforézis után a géleket 10 percig 10%-os triklór-ecetsavban fixáltuk, 5 percig desztillált vízben mostuk, majd 30 percig festettük 10 mg/ml o-dianizidint, 51 mM Tri-nátrium-citrátot (pH 4.4) és 0.7% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó oldattal.

A PPIX mennyiségeket Miyamoto és mtsai. (1992) szerint spektrofluorimetriás módszerrel határoztuk meg. A mikroaerob körülmények között növesztett *S. meliloti* baktériumokat centrifugáltunk és 15 ml fiziológiás sóoldattal mostuk. A sejteket 3 ml térfogatú aceton/0,1 M NH<sub>4</sub>OH (9:1, térfogat/térfogat) oldatban szuszpendáltuk, majd ismét centrifugáltuk. Az így nyert felülúszót 404 nm-en gerjesztettük, és az emissziót 633 nm-en mértük Photon Technology International spektrofluoriméteren.

#### **4.6. „Respirációs” nitrát-reduktáz aktivitás kimutatása**

A szilárd táptalajon növesztett baktérium telepekre 10 mM NaNO<sub>3</sub> 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.

#### **4.7. Növényi teszt és növényi szárazsúly meghatározás**

A *Medicago sativa* spp. *sativa* cv. Sitel magokat 5 percig 96%-os etanollal, majd 5 percig 0,1 %  $\text{HgCl}_2$ -al sterilizáltuk, majd 8-10-szer steril desztillált vízzel átmostuk és 1 óra hosszat  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on vízben tároltuk. Ezután 1%-os agarra szélesztettük őket, majd szobahőmérsékleten való csíráztatás után nitrogénforrást nem tartalmazó szilárd Gibson táptalajon, steril körülmények között növesztettük tovább. A 3 napos lucerna csíranövényeket a megfelelő baktérium törzsekkel inokuláltuk, majd két hónapig  $20\text{-}22\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 16 óra fény-8 óra sötét megvilágítási ciklust alkalmazva növesztettük. Ezután a növények sziklevelel fölötti zöld részét összegyűjtöttük,  $68\text{ }^\circ\text{C}$ -on 40 óra hosszat szárítottuk, majd megmértük a növények szárazsúlyát.

#### **4.8. $\beta$ -galaktozidáz aktivitás meghatározása**

A *S. meliloti* törzseket  $34\text{ }^\circ\text{C}$ -on a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó táptalajban felnövesztettük, és úgy hígítottuk, hogy optikai denzitásuk  $600\text{ nm}$ -en  $0,1$  legyen. Ezután a baktériumokat felnövesztettük  $\text{OD}_{600}=0,5$  értékig és a tenyészet egy részéből  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást mértünk Miller és mtsai. (1972) módszere alapján. A tenyészet többi részét mikroaerobizáltuk (a 3.1. részben leírt módszerrel) és tovább növesztettük, majd a 4 óra hosszat mikroaerob növesztett baktériumokban is megmértük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást. Az aktivitás egysége  $1000 \times \text{OD}_{420}/\text{perc} \times \text{OD}_{600} \times \text{ml}$ . Gümőből történő aktivitás mérések esetén a lucerna növényeket olyan vad típusú, illetve az *actR* génben mutáns baktériumokkal inokuláltuk, melyek

hordozták a pAT522 plazmidot a *cycH-lacZ* fúzióval. Az inokulálást követő 4 illetve 6 hét elteltével 20-30 mg gümőt gyűjtöttünk és homogenizáltunk 1 ml 0 °C-os 250 mM mannitol-5 mM Tris (pH 7,0) pufferben. Ezt követően a mintákat 30 percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk. A felülúszóból enzimaktivitást, és (Bio-Rad protein microassay módszerrel) fehérje koncentrációt határoztunk meg. Az aktivitás egysége 1000x OD<sub>420</sub>/percx mgx ml.

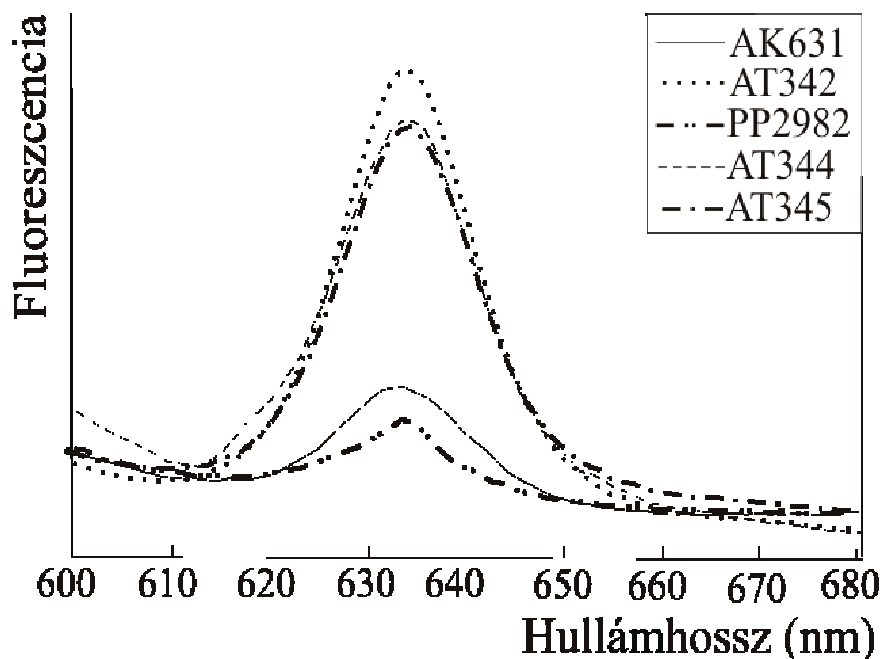
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A *cyc* gének mutációjának hatása a hem bioszintézisre

A *cycHJKL* génekből mutációt hordozó *S. meliloti* baktériumok a Cyc fehérjék hiányában nem képesek a hem prosztetikus csoportot a *c*-típusú citokróm apoproteinekre kapcsolni. Feltételezésünk az volt, hogy a Cyc fehérjék hiánya valószínűleg a hem és apoprotein prekursorok felhalmozódását eredményezheti, mely hatással lehet a két komponens bioszintézisére.

Ahhoz, hogy e mutációknak a hem bioszintézisre kifejtett hatását megvizsgáljuk, először a hem első prekursorának szintéziséért felelős  $\delta$ -aminolevulinsav szintáz kódozó *hemA* gén kifejeződését mértük meg a *cyc* mutáns és vad típusú baktériumokban. A *hemA* gén expresszióját a *hemA* promóterhez kapcsolt *lacZ* riporter génről megnyilvánuló  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának mérésével követtük. A *hemA-lacZ* fúziót hordozó pXLGD4 plazmidot (Leong és mtsai. 1985) konjugációval bevittük az AK631 vad típusú törzsbe, valamint az AT342 (*cycH::Tn5*), PP2982 (*cycH::Tn5*), AT344 (*cycJ::Tn5*) és AT345 (*cycK::Tn5*) mutáns törzsekbe. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást aerob és mikroaerob körülmények között növesztett tenyészetekből mértük. A *hemA* gén kifejeződése nem változott a mutánsokban a vad típusú baktériumokhoz képest.

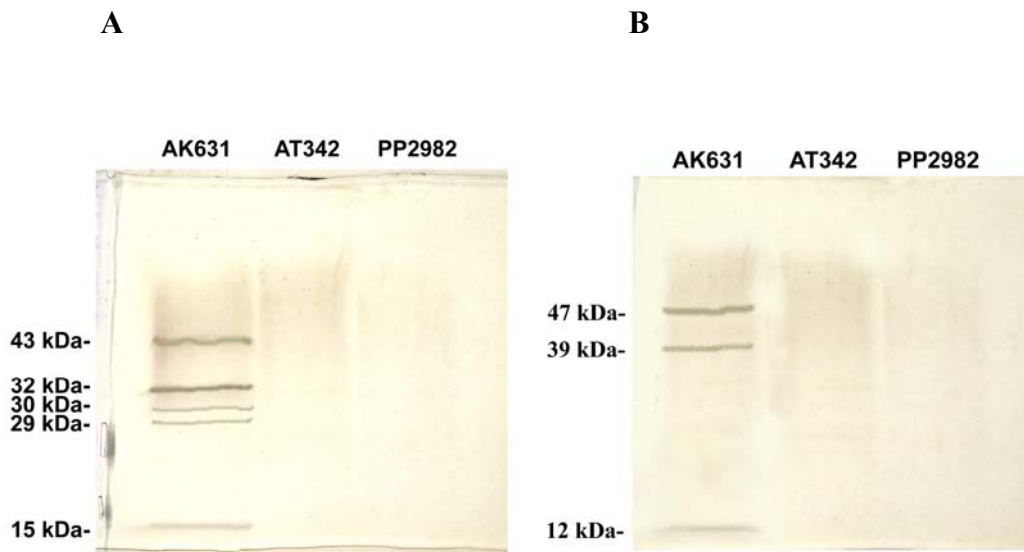
Ezután ugyanezekben a törzsekben a hem közvetlen prekursorának, a PPIX-nek a mennyiségét vizsgáltuk meg. A *cyc* mutánsokban PPIX felhalmozódást tapasztaltunk a vad törzshöz képest (10. ábra). Azonban a többi *cyc* génben mutációt hordozó törzssel ellentétben, a PP2982 (*cycH::Tn5*) törzsben nem halmozódott fel a PPIX. A két *cycH* mutáns törzsben (AT342, PP2982) kapott eltérő PPIX szintek alapján azt feltételeztük, hogy az inszerció esetleges poláris hatásának következtében az egyik esetben a többi *cyc* gén sem fejeződik ki, míg a másik esetben a mutáció nem befolyásolja az operon többi tagjának expresszióját. A PP2982 törzs, akárcsak a



**10. ábra** AK631 vad típusú és *cyc* génekben mutáns (AT342, PP2982, AT344 és AT345) *S. meliloti* baktérium törzsek kivonatának fluoreszcencia spektruma. A kivonatokat 405 nm-en gerjesztettük.

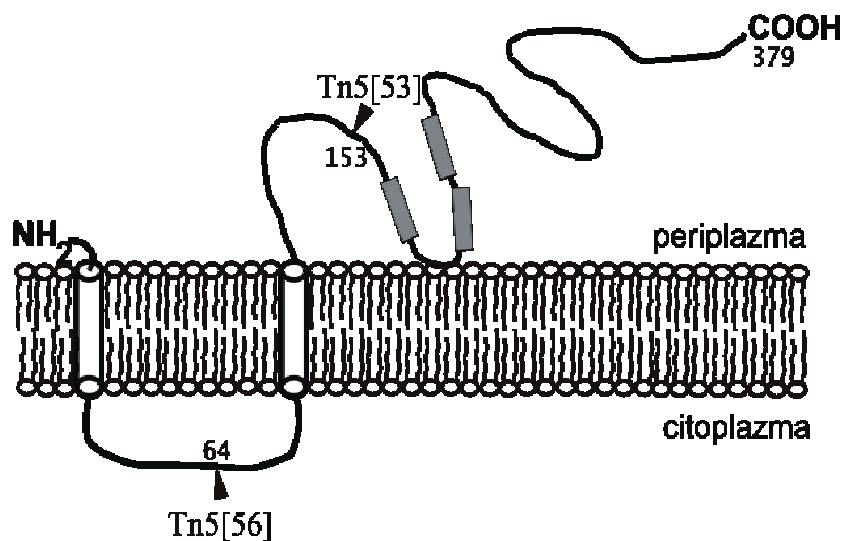
korábban leírt *cyc* mutánsok (Kereszt és mtsai. 1995) nem volt képes a légköri nitrogént megkötni ( $\text{Fix}^-$ ) (lásd később), és nitrát-reduktáz hiányos ( $\text{Rnr}^-$ ) fenotípust mutatott (lásd később), mivel a nitrát-reduktáz enzimhez elektronokat szállító *c*-típusú citokrómok hiányában az enzim nem működött. Annak ellenére, hogy a PP2982 baktériumokban nem halmozódott fel a PPIX, a törzsből készített fehérje kivonatban nem tudunk kimutatni *c*-típusú citokrómokat (11. ábra). A további vizsgálatokhoz szükséges volt a két Tn5 inszerció helyének pontos ismerete. Mivel ezt a PP2982 törzsben még nem határozták meg, ezért DNS szekvenálással megállapítottuk, hogy a Tn5 a *cycH* gén 459-edik bázispárjánál épült be. A Cych fehérje a 3. és 22., valamint a 95. és 115. aminosavai között két transzmembrán domént tartalmaz, melyek közrezárnak egy citoplazmatikus hurkot, a 264 aminosavból álló C-terminális szakasz pedig a periplazmába nyúlik (Kereszt és mtsai. 1995). Megállapítottuk, hogy a PP2982 törzsben a Tn5[53] inszerció a fehérje C-terminális szakaszának az elején található (12. ábra). Az AT342 mutánsban a Tn5[56] a *cycH*



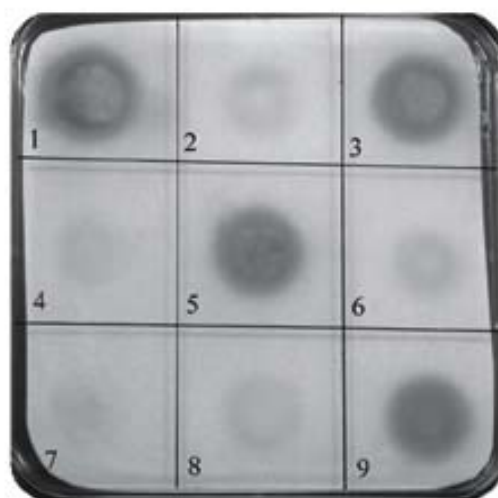


**11. ábra** A mikroaerob körülmények között növesztett vad típusú (AK631) és két *cycH* mutáns (AT342 és PP2982) törzsből izolált fehérjék gélelektroforézise  
A membrán (A) és szolubilis (B) fehérje frakciókat az elválasztást követően kovalensen kötött hem kimutatására alkalmas módszerrel festettük.

gén 192. bázispárja mögé épült be, a fehérje citoplazmatikus hurkát kódoló régióba. Ahhoz, hogy a *cycH* génben levő két független mutáció esetleges poláris hatását megvizsgáljuk a *cycH* gén után elhelyezkedő *cyc* génekre, komplementációs kísérleteket végeztünk. Az ép *cycH* gént hordozó pGC292 plazmidot bevittük az AT342 és PP2982 *cycH* mutáns törzsekbe. Ha a többi *cyc* gén transzkripcióját nem befolyásolja a Tn5 inszerció, a Cyc fehérjék funkciója nem károsodott, a *c*-típusú citokrómok létrejönnek. A funkcionális *c*-típusú citokrómok jelenlétének a vizsgálatához a nitrát-reduktáz enzim működését ellenőriztük. Mindkét mutáns esetében Rnr<sup>+</sup> fenotípust kaptunk (13. ábra), vagyis a plazmidon található *cycH* gén komplementálta mindkét Rnr<sup>-</sup> fenotípusú *cycH* mutánst. Eredményeink tehát arra utaltak, hogy a Tn5 transzpozonnak egyik törzs esetében sincs poláris hatása a mögötte lévő génekre. Adatainkat összegezve azt találtuk, hogy a *cycJ*, *cycK* és *cycL* gének, valamint a *cycH* gén 5' végi 459 bázispárja, vagyis a PP2982-



**12. ábra** Az AT342 és PP2982 mutánsokban levő Tn5[56] illetve Tn5[53] inszerciók elhelyezkedése a *S. meliloti* CycH fehérje különböző régióiban  
Az inszercióknál feltüntetett számok az aminosavat jelentik. A szürke téglalapok tetratrikopeptid doméneket jelölnek. Az itt bemutatott szerkezeti modell Lang és mtsai. (1996) alapján készült.

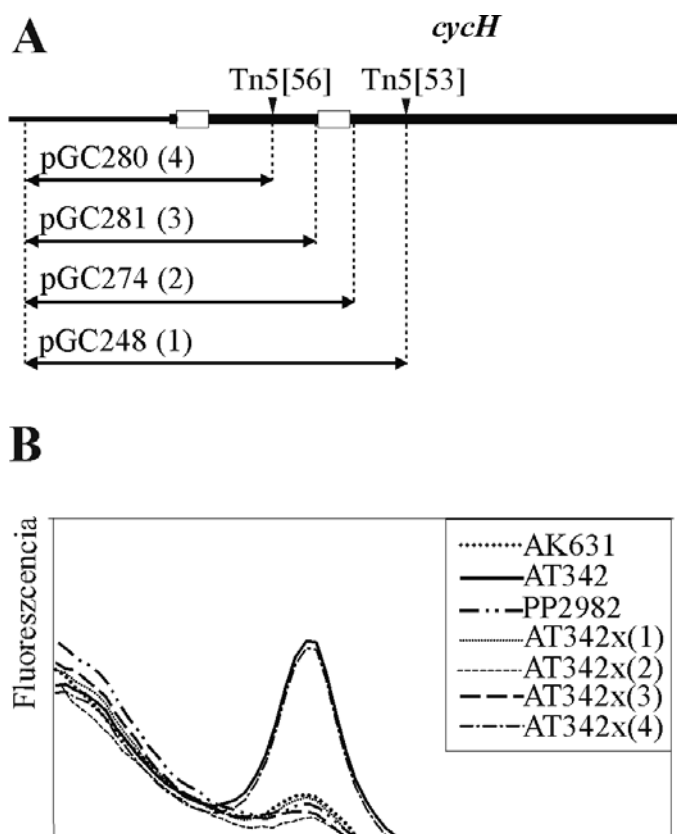


**13. ábra** Különböző baktérium törzsek respirációs nitrát-reduktáz aktivitásának kimutatása színreakcióval  
1: AK631 vad típusú törzs, 2: PP2982 *cycH* mutáns, 3: PP2982 (pGC292), 4: AT342 *cycH* mutáns, 5: AT342 (pGC292), 6: AT342 (pGC333), 7: AT342 (pGC335), 8: AT342 (pGC306) és 9: AT342 (pGC269). A 6-9 mintákra vonatkozó kísérletet lásd az 5.3. alfejezetben.

ben levő Tn5[53] inszercióig terjedő szakasz szükséges ahhoz, hogy a *S. meliloti* baktériumoknak vad típusú PPIX fenotípusa legyen.

## **5.2. A CycH fehérje N-terminális szakaszának szerepe a PPIX szint meghatározásában**

Előző eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a CycH fehérjének a Tn5[56] és Tn5[53] inszerciók közti szakasza fontos szerepet tölt be a PPIX szintjének meghatározásában. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a két Tn5 közötti 89 aminosavból álló szakaszon vajon a periplazmába nyúló 38 aminosavnyi szakasznak, a második transzmembrán doménnek, vagy a citoplazmatikus 31 aminosavnak van-e szerepe a fentiekben említett folyamatban. Kísérleteinkben a pGC274 és pGC281 plazmidokat használtuk, melyek közül az előbbi a CycH fehérjét a periplazmatikus szakaszig (112 aminosav), az utóbbi pedig a második transzmembrán doménig (96 aminosav) kódolja. E két konstrukciót az AT342 törzsbe vittük be konjugációval. Azt tapasztaltuk, hogy mindkettő helyreállítja a vad PPIX fenotípust (14. ábra). Mint ahogyan várható volt, a pGC280 konstrukció, mely a *cycH* gént az AT342 inszercióig kódolja, nem volt képes megváltoztatni az AT342 törzs PPIX fenotípusát. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a CycH fehérje 96 aminosavnyi N-terminális szakasza, beleértve a fehérje első transzmembrán doménjét a citoplazmatikus hurkkal együtt, fontos szerepet játszik az alacsony PPIX szint megőrzésében.



**14. ábra** A Cych fehérje Tn5[56] és Tn5[53] mutációk közti szakaszának vizsgálata  
**A** Plazmid konstrukciók. A téglalapok jelzik a *cycH* gén két transzmembrán domént kódoló szakaszát. **B** A vad típusú törzs, két *cycH* génben mutáns, valamint az AT342 törzset különböző plazmidokkal komplementált klónok kivonataiból mért PPIX szintek.

### 5.3. A Cych fehérjében található tetratrikopeptid domének szerepének vizsgálata

A Cych fehérje 96 aminosavból álló N-terminális részének fontos szerepe van a hem bioszintézis utolsó lépéseiben. A fehérje nagyrészét azonban egy 264 aminosavból álló periplazmatikus C-terminális szakasz alkotja. E régió funkcionális szerepének megismerésére az NCBI RPS Blast programmal analizáltuk e szakasz szekvenciáját, és három tetratrikopeptid (TPR) domént azonosítottunk rajta (12. és 15. ábra). A TPR domének irodalmi adatok alapján fehérje-fehérje interakciókban töltenek be szerepet, ezáltal multiprotein komplexeket képesek

létrehozni (Lamb és mtsai. 1995, Blatch és mtsai. 1999). A 34 aminosavból álló TPR domének összehasonlítása alapján megállapították, hogy a különböző pozíciókban leggyakrabban fellelhető aminosavak a következők: 4. (W/L/F), 7. (L/Y/M), 8. (G/A/S), 11. (Y/L/F), 20. (A/S/E), 24. (F/Y/L), 27. (A/S/L) és 32. (P/K/A), melyek konszenzus szekvenciát alkotnak (Blatch és mtsai. 1999). Abban az esetben, ha a különböző funkciót ellátó fehérjék TPR doménjeit hasonlítjuk össze, a szekvencia hasonlóság e nyolc konszenzus aminosavra korlátozódik. Ez arra utal, hogy a TPR fehérjéknek a más fehérjékkel való kapcsolattartásában töltenek be fontos szerepet. E nyolc aminosav mindegyikét megtaláltuk a *S. meliloti* CychH fehérjének a harmadik TPR doménjében, az első TPR doménből hiányzott a 32. pozícióban levő konszenzus aminosav, a második TPR doménből pedig a 4., 7., 8. és 11. pozícióban lévő konszenzus aminosavak (15. ábra). Amint a 15. ábrán látható, a *S. meliloti*-val rokon fajok CychH homológjaiban is találtunk TPR domén szekvenciákat, melyek a konszenzus szekvenciával való homológia mellett a *S. meliloti* TPR doménjeiben levő további aminosavakkal is mutatnak homológiát. Ahhoz, hogy e három TPR domén szerepét a *S. meliloti* CychH fehérje funkciójában megvizsgáljuk, elkészítettük a pGC333, pGC335 és pGC306 plazmid konstrukciókat, melyekből a CychH fehérje egy-egy TPR doménjét eltávolítottuk. A pGC333 plazmid egy 78 bp hosszúságú, fázisban levő deléciót hordozó *cycH* gént tartalmaz (7. ábra, 8. ábra), és hiányzik belőle az első TPR domént kódoló régió. E konstrukció a pGC292 plazmiddal ellentétben (mely az ép *cycH* gént hordozza) nem volt képes helyreállítani az AT342 törzs Rnr<sup>-</sup> fenotípusát (13. ábra). A CychH fehérje második illetve harmadik TPR doménjét nem kódoló pGC335 és pGC306 plazmidok szintén nem komplementálták az AT342 törzs Rnr<sup>-</sup> fenotípusát. Amennyiben a pGC269 plazmiddal komplementáltuk az AT342 törzset, mely egy csonka, a C-terminális végén 70 aminosavat nem

			4	7	8	11			20	24	27	32																									
			<b>F</b>	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>L</b>			<b>S</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>K</b>																									
Konszenzus			L	L	G	Y			A	Y	A	P																									
			<b>W</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>F</b>			<b>E</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>E</b>																									
<b>A</b>	<i>Sm</i>	154	G	A	G	W	D	L	L	A	P	I	Y	M	R	H	G	R	L	D	D	A	V	A	A	Y	D	R	A	I	R	L	L	G	P	T	187
	<i>Bj</i>	153	G	R	G	W	N	V	L	A	P	V	L	E	R	L	G	R	F	D	D	A	V	R	A	Y	R	N	S	I	T	Y	N	G	E	S	186
	<i>Rl</i>	151	G	K	G	W	D	V	L	A	P	I	Y	F	R	I	M	R	V	D	D	A	Q	V	A	Y	R	N	A	I	R	L	L	G	P	S	184
	<i>Ml</i>	156	G	R	G	W	D	V	L	A	P	V	Y	L	R	M	Q	R	F	S	D	A	V	A	A	Y	R	N	A	I	R	L	D	G	D	S	189
	<i>Ec</i>	222	I	E	G	W	I	M	L	G	R	V	G	M	A	L	G	N	A	S	I	A	T	D	A	Y	A	T	A	Y	R	L	D	P	K	N	255
<b>B</b>	<i>Sm</i>	191	M	G	G	Y	A	E	A	L	V	A	Q	A	G	G	L	V	T	A	E	A	Q	N	A	L	Q	K	A	L	A	L	D	E	D	224	
	<i>Bj</i>	190	R	S	D	L	G	E	A	I	S	A	A	A	G	G	V	V	T	A	E	A	K	T	E	F	E	R	A	H	A	L	N	A	D	223	
	<i>Rl</i>	188	L	D	G	L	A	E	T	L	M	A	V	S	D	G	V	V	T	E	E	A	R	Q	V	L	E	Q	S	V	T	L	Q	P	D	221	
	<i>Ml</i>	193	Q	A	G	L	G	E	A	I	A	G	A	G	G	I	V	S	A	D	A	Q	D	A	F	E	A	A	L	K	L	D	E	A	N	226	
	<i>Ec</i>	259	A	L	G	Y	A	E	A	L	T	R	S	S	D	P	N	D	N	R	L	G	G	E	L	L	R	Q	L	V	R	T	D	H	S	N	292
<b>C</b>	<i>Sm</i>	226	P	S	A	F	Y	L	A	L	G	L	K	Q	E	G	R	H	A	E	A	L	A	A	F	R	K	L	A	E	S	S	P	A	D	258	
	<i>Bj</i>	224	P	K	A	N	Y	F	L	G	L	A	A	E	Q	D	G	R	K	D	D	A	A	T	I	W	R	A	L	L	A	K	A	P	A	D	257
	<i>Rl</i>	222	P	R	A	R	F	Y	I	A	L	S	M	E	Q	A	G	Q	P	D	E	A	R	Q	A	F	E	A	L	A	K	Q	S	P	S	D	255
	<i>Ml</i>	227	A	K	A	N	F	Y	L	A	M	A	L	A	Q	E	G	R	S	K	E	A	A	T	A	W	Q	A	M	L	G	T	L	P	P	D	260
	<i>Ec</i>	293	I	R	V	L	S	M	Y	A	F	N	A	F	E	Q	Q	R	F	G	E	A	V	A	A	W	E	M	M	L	K	L	L	P	A	N	326

**15. ábra** Különböző baktérium fajok CychH-val homológ fehérjében talált TPR szekvenciák összehasonlítása a TPR konszenzus szekvenciával

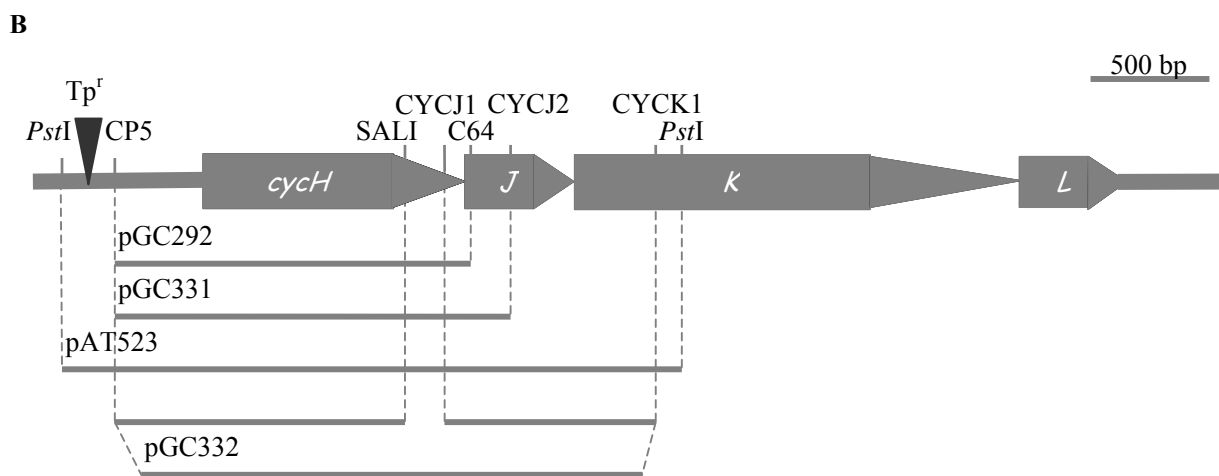
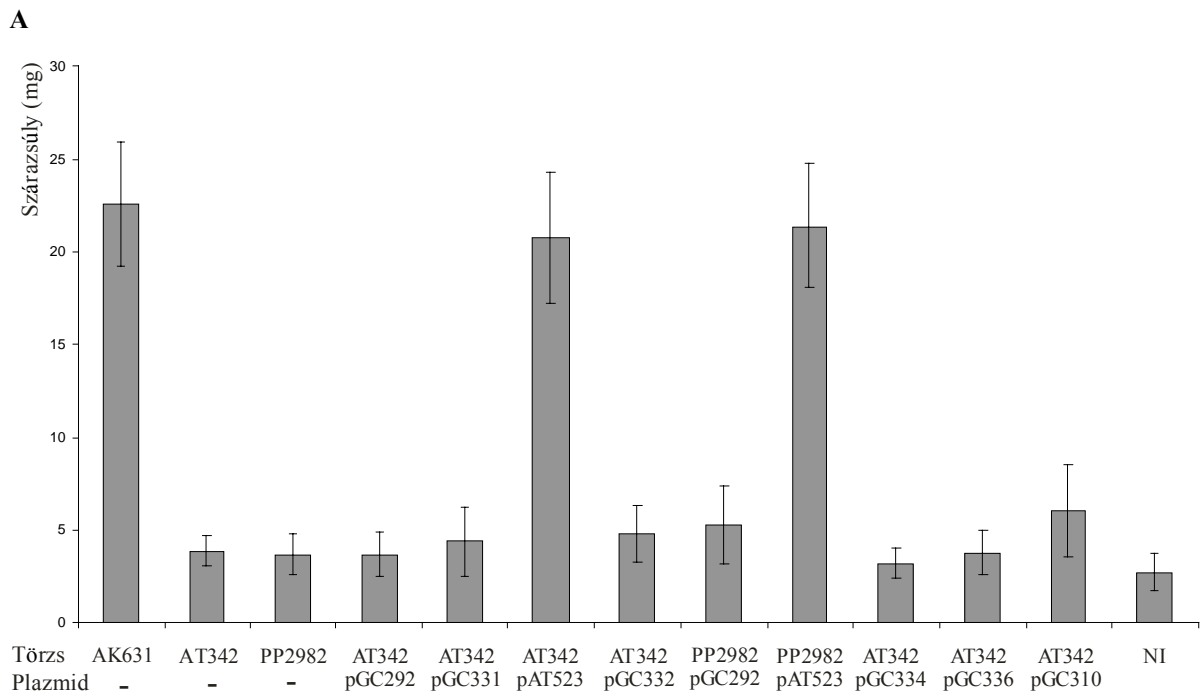
A feketével kiemelt aminosavak azonosak a konszenzussal. A fehérrel, világos- és sötétszürkével kiemelt aminosavak konzervált kis-, nagy hidrofób, valamint töltéssel rendelkező, vagy poláris aminosavakat jelölnek. Jelmagyarázat: **A**, első TPR domén; **B**, második TPR domén; **C**, harmadik TPR domén; *Sm*, *Sinorhizobium meliloti*; *Bj*, *Bradyrhizobium japonicum*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarm*; *Ml*, *Mesorhizobium loti*; és *Ec*, *Escherichia coli*.

tartalmazó CychH fehérjét kódol, de mindhárom TPR domént tartalmazza, a Rnr<sup>-</sup> fenotípus helyreállt (13. ábra).

#### 5.4. A *cycH* mutánsok Fix fenotípusának komplementálása

A pGC292 plazmidon található teljes hosszúságú *cycH* gén komplementálta mindkét *cycH* mutáns törzs Rnr fenotípusát. Ha azonban a pGC292 plazmidot hordozó *cycH* mutáns baktériumokkal inokuláltuk a lucerna növényeket (két független kísérletben 50-50 növény), ezek

nitrogénhiányos táptalajon elsárgultak, ugyanis a keletkezett szimbiotikus gümőkben a bakteroidok nem voltak képesek megkötni a légköri nitrogént, azaz  $\text{Fix}^-$  fenotípust mutattak. Ha a mutáns törzsek a pAT523 plazmidot hordozták, mely a *cycH* mellett a teljes *cycJ* gént is tartalmazta, a vad típusú baktériumokra jellemző  $\text{Fix}^+$  fenotípus helyreállt (16. ábra). Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ebben az esetben a teljes *cycJ* génre van-e szükség, vagy ennek csupán egy szakasza is elegendő a  $\text{Fix}^+$  fenotípus helyreállításához. Elkészítettük a pGC342 konstrukciót, melyben a *cycH* gén mögött a *cycJ* génnek az 5' végi 234 bázispárja (körülbelül a gén fele) volt jelen. Amint a 16. ábrán is látható, a pGC342 plazmidot tartalmazó AT342 törzssel inokulált növények szárazsúlya megegyezik azokéval, melyeknél a baktériumok csupán a *cycH* gént tartalmazzák a komplementáló plazmidon. Tehát a  $\text{Fix}^+$  fenotípus helyreállításához a *cycH* gén mellett nagy valószínűséggel a teljes *cycJ* génre is szükség van. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a TPR deléziós konstrukciók képesek-e helyreállítani a  $\text{Fix}$  fenotípust. Ezért elkészítettünk három olyan plazmidot (pGC334, pGC336, pGC310), melyben a TPR deléciókat hordozó *cycH* gén mögé fázisban beépítettük a teljes *cycJ* gént is. Ezeket a plazmidokat konjugációval bevittük az AT342 *cycH* mutáns törzsbe. A kapott klónokkal lucerna növényeket inokuláltunk, majd a kapott szárazsúlyból a  $\text{Fix}$  fenotípusukra következtettünk. A TPR deléziós klónok a  $\text{Fix}$  fenotípust sem voltak képesek helyreállítani az AT342 mutáns törzsben (16. ábra).



**16. ábra A** Különböző baktériumokkal inokulált lucerna növények szárazsúlya az inokulálás után két hónappal

A növényi tesztben felhasznált törzsek: AK631 vad típusú törzs, az AT342 és PP2982 *cycH* mutáns törzsek, valamint a különböző plazmidokkal komplementált mutánsok (lásd B rész és 2. táblázat). NI: nem inokulált kontrol.

**B** A *cycHJKL* operon vázlatos ábrázolása, az egyes plazmid konstrukciókkal A felhasznált oligonukleotida primerek, valamint restrikciós enzim hasító helyek az operon felett vannak feltüntetve.



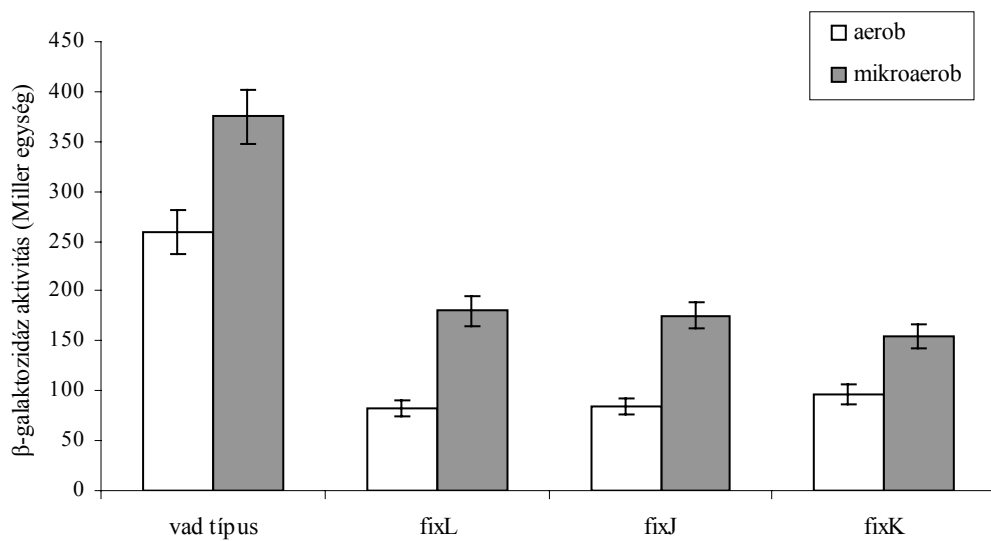
### **5.5. A *cycHJKL* operon kifejeződése mikroaerob körülmények között indukálódik**

A szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc alegységeit kódoló *fixNOQP* operon kifejeződése mikroaerob körülmények közt lényegesen megnő (David és mtsai. 1988). A Cyc fehérjéknek többek között feladata az is, hogy a FixO és FixP *c*-típusú citokróm apoproteinekhez kovalensen hozzákapcsolják a hem csoportot, és ezáltal funkcionális *c*-típusú citokrómot hozzanak létre. Ezért azt feltételeztük, hogy a Cyc fehérjék is nagyobb mennyiségben képződhetnek mikroaerob körülmények között. Megvizsgáltuk, hogy a *cycHJKL* operon kifejeződése változik-e alacsony oxigénkoncentrációnál az aerob körülményekhez képest. Ennek meghatározására a *cyc* operon promóterét a *cycH* gén elejével beépítettük a pEP82 széles gazdaspecificitású plazmid *lacZ* riporter génje elé. Az így létrejött pAT522 konstrukciót bevittük a *S. meliloti* 2011 (GMI708) vad típusú baktérium törzsbe. Ezután a riporter génről kifejeződő  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérésével követtük a *cyc* operon promóter aktivitását. A várakozásnak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a *cycH* gén aerob körülmények között is kifejeződött, mikroaerob körülmények között pedig expressziója megnövekedett (17. ábra).

### **5.6. A *cycHJKL* operon mikroaerob indukációjának szabályozása**

*S. meliloti*-ban a FixL/J kétkomponensű jelátvivő rendszer (David és mtsai. 1988) fontos szerepet tölt be a szimbiotikus körülmények között indukálódó gének (*nif*, *fix*) transzkripciójának szabályozásában. A rendszer érzékelő komponense az alacsony oxigén koncentráció hatását a regulációs komponenshez közvetíti, amely a szabályozott gének transzkripcióját indukálja. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a FixL és FixJ fehérjék esetleges szerepét a *cyc* operon mikroaerob indukációjában is. A *cyc* operon kifejeződését az előzőekben is használt *cycH-lacZ* fúziót hordozó pAT522 plazmid segítségével mértük meg. A pAT522 konstrukciót konjugációval a vad típusú

törzs mellett bevittük a GMI5705 (*fixL*::Tn5) valamint a GMI5704 (*fixJ*::Tn5) mutáns törzsekbe is, majd e baktériumokból  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitást mértünk. Azt tapasztaltuk, hogy a mutánsokban az aktivitási értékek alacsonyabbak voltak ugyan a vad típusban mért értékeknél, de a mikroaerob indukció itt is tapasztalható volt (17. ábra). A mutánsokban aerob körülmények között is alacsonyabb aktivitást lehetett detektálni, mint a vad típusú sejtekben. Ennek lehetséges

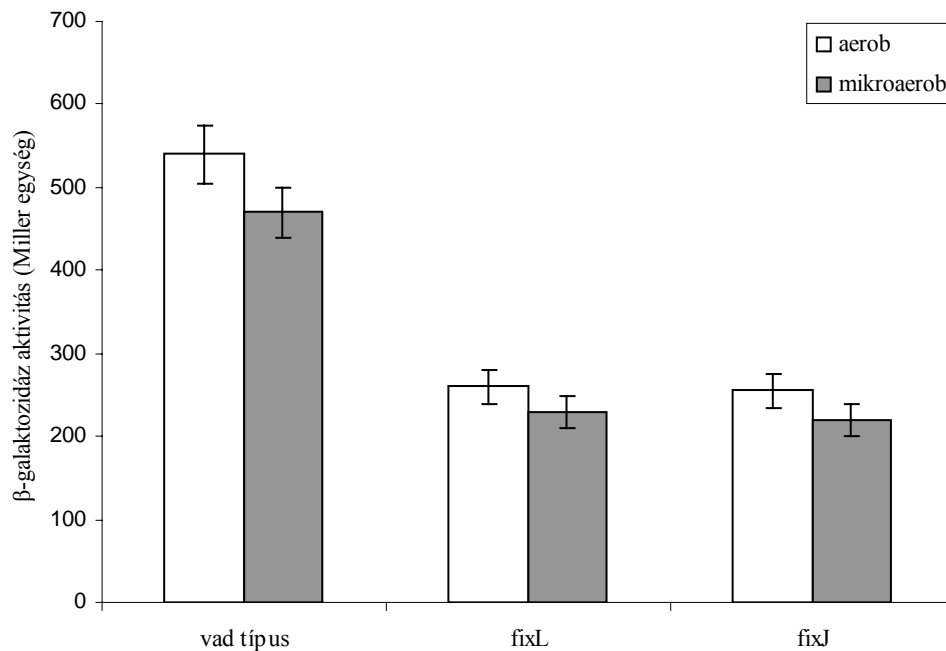


**17. ábra** A *cyc* operon kifejeződése a vad típusú baktériumban, valamint *fixL*, *fixJ*, és *fixK* mutáns törzsekben

Három független kísérletben két-két klónból mértük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást.

okát egy kontrol kísérletben kívántuk tisztázni, melyben egy oxigénkoncentrációtól függetlenül kifejeződő gént vizsgáltuk meg ugyanezen törzsekben. Az *rkpZ* gént választottuk ki a kísérlethez, melynek a *lacZ* riporter génnel alkotott fúzióját tartalmazó plazmidot (pAT582) bevittük a vad típusú és a két mutáns törzsbe, majd  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást mértünk. Az *rkpZ* gén a *S. meliloti* 41 baktérium kapszuláris poliszacharidja lipid lánchosszának meghatározásában játszik szerepet.

$\beta$ -galaktozidáz aktivitás méréseinkből (18. ábra) látható, hogy a várakozásnak megfelelően az *rkpZ* gén kifejeződése nem indukálódik mikroaerob körülmények között, azonban ennek a génnek a transzkripciója is alacsonyabb szintű a *fixL* és *fixJ* mutáns törzsekben. Ezen adatok



**18. ábra** Az *rkpZ* gén kifejeződése vad típusú, és *fixL*, *fixJ* mutáns törzsekben. Két független kísérletben két-két klónból mértük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást.

alapján azt feltételeztük, hogy a mutánsokban kapott alacsonyabb aktivitási értékek valószínűleg a *fixL* illetve *fixJ* mutációk által okozott nem specifikus hatásnak köszönhetők, nem pedig a FixL/J rendszer *cyc* operonra gyakorolt hatásának.

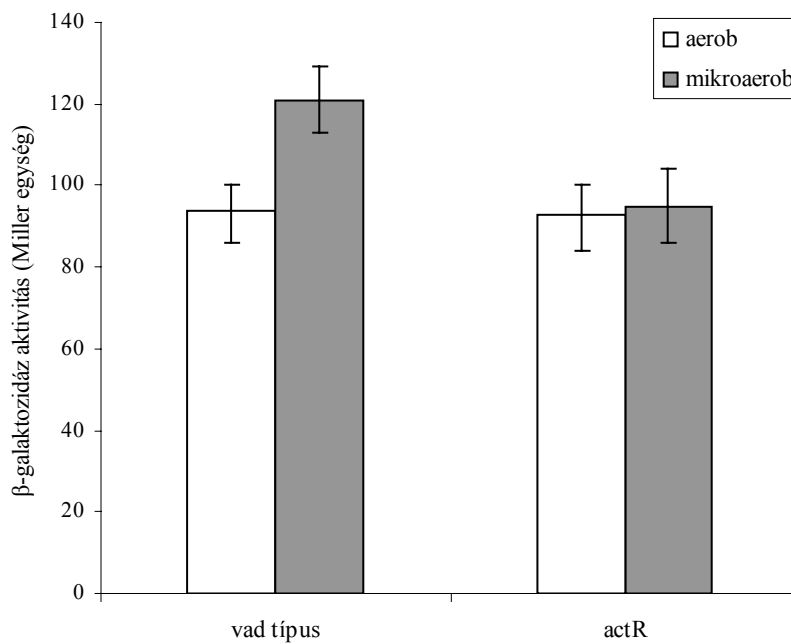
További kísérleteinkben a FixL/J regulációs kaszkádba tartozó FixK fehérje esetleges szabályozó szerepét vizsgáltuk meg. A FixK fehérje nagyfokú homológiát mutat az *Escherichia coli*-ban O<sub>2</sub> szenzor szerepet betöltő Fnr fehérjével, mely anaerob körülmények között alternatív terminális akceptorok működését indítja be (Griffiths és Cole 1987, Spiro és Guest 1987). Ezért

megvizsgáltuk, hogy a FixK szerepet játszhat-e a *cyc* gének mikroaerob indukciójában. A GMI5630 (*fixK*<sub>1</sub> Δ , *fixK*<sub>2</sub>::Tn5) mutáns törzsben a *cycH* gén a *fixL* és *fixJ* mutánsokban mért értékekhez hasonlóan fejeződött ki. A *fixK* mutánsban is alacsonyabb génkifejeződést tapasztaltunk, mint a vad típusú baktériumokban, és ekkor is megnyilvánult a mikroaerob indukció hatása (17. ábra). Ez arra utalt, hogy a FixK fehérjének sincs szerepe a *cyc* operon oxigénszinttől függő szabályozásában.

Egy további lehetséges jelölt az ActS/R fehérjepár volt. A *S. meliloti* ActS/R jelátvivő rendszerről ismeretes, hogy az ActS fehérje a környezet alacsony pH szintjét érzékeli, és az ActR fehérjén keresztül olyan géneket aktivál, melyek az alacsony pH szinten való túlélést biztosítják (Tiwari és mtsai. 1996). E két fehérje nagyfokú homológiát mutat a *Rhodobacter capsulatus*-ban, *Rhodobacter sphaeroides*-ben és *Bradyrhizobium japonicum*-ban leírt RegB/A, PrrA/B illetve RegS/R fehérjékkel, melyeknek az alacsony oxigénszint érzékelésében és közvetítésében van szerepük. Emmerich és mtsai. (2000a) bizonyították, hogy az említett jelátvivő rendszerek transzkripciós regulátorai funkcionálisan is helyettesíthetik egymást. Például a *S. meliloti* ActR fehérje *in vivo* és *in vitro* körülmények között képes kötődni a *Bradyrhizobium japonicum fixR-nifA* operonjának promóterére, amelyet a RegR fehérje szabályoz. A *fixR-nifA* operon transzlációs startja előtt –81 nukleotidával (Emmerich és mtsai. 2000b) a [5'-GNGGCGTTNNGNCGC-3'] RegR-kötő motívumot azonosították és kimutatták, hogy a feltüntetett nukleotidák mindegyike nélkülözhetetlen a RegR fehérje kötődéshez. Megvizsgáltuk, hogy a *S. meliloti cyc* operonjának promóterében található-e ehhez homológiát mutató szekvencia. A *cyc* operon transzlációs startja előtt –127 nukleotidával a következő szekvenciát azonosítottuk, mely nagyfokú homológiát mutat a *fixR-nifA* promóterben található RegR-kötő motívummal:

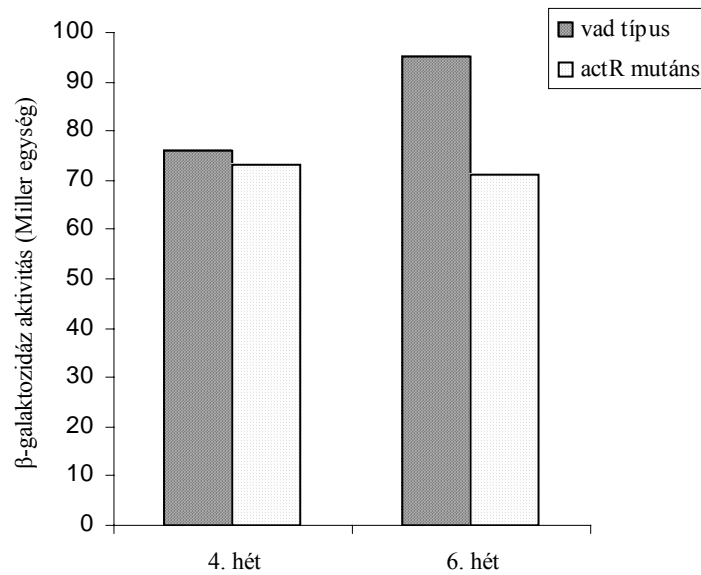
ActR box ? (*cycHJKL*)    5'-AAGGTGTTGAATCGC-3'  
 RegR box (*fixR-nifA*)    5'-GNGGCGTTNNGNCGC-3'

Ezért megvizsgáltuk a *S. meliloti* ActS/R rendszer esetleges hatását a *cycHJKL* operon kifejeződésére mikroaerob körülmények között. Elkészítettük a GC351 *actR* génben mutáns baktérium törzset. A *cycH-lacZ* fúziót hordozó pAT522 plazmidot bevittük a GMI211 vad típusú és GC351 *actR* mutáns baktériumokba, majd  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást mértünk aerob és mikroaerob körülmények közt (19. ábra). A vad típusú törzsben 21%-os mikroaerob indukciót



**19. ábra** A *cyc* operon kifejeződése szabadon élő vad típusú és *actR* mutáns törzsekben. Három független kísérletben két-két klónból mértük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást.

mértünk, míg az *actR* mutánsban az aerob és mikroaerob mintákból mért enzimaktivitás megegyezett. A riporter gén segítségével kapott adatokat lucerna gazdanövényvel kialakított, szimbiotikus gümőkötő történő aktivitás mérésével ellenőriztük. Lucerna növényeket inokuláltunk a *cycH-lacZ* fúziót hordozó vad típusú és *actR* mutáns törzsekkel. Az inokulálás után 4 illetve 6 hét elteltével a keletkezett lucerna gümőkötő  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást mértük (20. ábra). Az



**20. ábra** A *cyc* operon kifejeződése a vad típusú és *actR* mutáns törzsekkel inokulált lucerna gümőkben, az inokulálás utáni 4. és 6. héten. Ötven-ötven növény gümőiből előállított kivonatból mértük a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást.

inokulálást követő 4. héten nem tapasztaltunk különbséget a vad típusú és *actR* génben mutáns baktériumokból mért enzimaktivitási értékek között. Az inokulálást követő 6. héten azonban, a vad típusú baktériumokkal inokulált gümők esetében 25%-os aktivitás növekedést tapasztaltunk a 4. héten mért értékhez képest, míg az *actR* mutáns törzssel inokulált gümőkben a *cycH* gén kifejeződése nem változott. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az ActR fehérje mind szabadon élő mikroaerob tenyészetekben, mind pedig szimbiotikus körülmények között hozzájárul a *cyc* operon kifejeződésének szabályozásához.

## 6. MEGVITATÁS

A *S. meliloti* CycH, CycJ, CycK és CycL fehérjéi egy citokróm *c* hem liáz enzimkomplexet alkotnak, mely szerepet játszik a *c*-típusú citokrómok biogenezisében. A fehérje komplex a citokróm apoprotein és a hem kovalens kötését katalizálja. A dolgozat e fehérjék közül elsősorban a CycH szerepének vizsgálatával foglalkozik. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a CycH fehérje N- és C-terminális részei különböző funkciót töltenek be a *c*-típusú citokrómok biogenezisében, valamint azt, hogy az N-terminális egység a C-terminálistól független aktivitást mutat.

A *c*-típusú citokrómok nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc működésében. Ezért azt feltételeztük, hogy a *cyc* operon kifejeződése szimbiotikus körülmények között a megnövekedett energia igényeknek megfelelően magasabb szintű lehet, mint aerob körülmények között. A dolgozat második felében a *cycHJKL* operon kifejeződésével kapcsolatos eredményeinket írtuk le. Kimutattuk, hogy e gének transzkripciója alacsony oxigén koncentrációnál megnövekszik. Megvizsgáltuk több olyan fehérje szerepét, melyekről feltételeztük, hogy résztvehet a *cyc* operon mikroaerob indukciójában. Eddigi kísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy az ActS/R kétkomponensű jelátvivő rendszer a pH szintek érzékelése mellett (Tiwari és mtsai. 1996) képes lehet az alacsony oxigénszint érzékelésére és *cyc* operonhoz való közvetítésére is.

### 6.1. A CycH fehérje N-terminális funkcionális moduljának szerepe a *c*-típusú citokrómok biogenezisében

Korábbi kísérleti eredmények bizonyították, hogy a CycH fehérje a citokróm *c* apoproteinnel kölcsönhatásba lépve biztosítja annak megfelelő konformációját, míg a hem

prosztetikus csoport a komplex többi fehérjéje segítségével kovalens módon rákapcsolódik (Ritz és mtsai. 1993, Page és Ferguson 1995, Lang és mtsai. 1996). Kísérleteink során kimutattuk, hogy a *cyc* génekben mutáns baktérium törzsekben (a PP2982 *cycH* mutáns törzset kivéve) felhalmozódott a hem közvetlen prekuzora, a PPIX. A hem bioszintézis egy korai lépését vizsgálva nem tapasztaltunk változást a *cyc* mutánsokban a vad típusú törzshöz képest: a *hemA* gén ugyanolyan mértékben fejeződött ki. A PPIX felhalmozódást a Cyc fehérjék hiányának tulajdonítottuk, ugyanis ezek nélkül a hem csoport nem volt képes a periplazmába továbbjutni és az apoproteinre kötődni, ezáltal a prekuzora felhalmozódott. Eredményeinkből kiderült, hogy a vizsgált két *cycH* mutáció egyike sem akadályozta meg (Tn5[56] és Tn5[53]) az operon többi tagjának, a *cycJ*, *cycK* és *cycL* géneknek a kifejeződését, így ezzel a két mutáns különböző PPIX fenotípusa nem magyarázható. *Bradyrhizobium japonicum*-ban (Ritz és mtsai. 1993), valamint *Rhizobium etli*-ben (Tabche és mtsai. 1998) leírtak már olyan Tn5 inszerciós *cycH* mutánsokat, melyekben a transzpozon beépülésének nem volt poláris hatása. Ők a poláris hatás hiányát a Tn5 transzpozon „inverted repeat” szekvenciáiban található promóter-szerű szekvenciának tulajdonították. Saját további kísérleteink is ezt támasztották alá, ugyanis a PPIX felhalmozódást mutató AT344 (*cycJ*::Tn5) mutánsban levő Tn5 inszerciónak sem volt poláris hatása a *cycK* és *cycL* génekre, amint azt az AT344 törzs Rnr<sup>-</sup> fenotípusának *cycJ* génnel való komplementálhatósága bizonyította.

Kimutattuk, hogy a PP2982 mutánsban a 153 aminosavból álló N-terminális CycH fehérje szakasz képes volt a vad típusú PPIX szintet fenntartani. A *cycH* gént különböző hosszúságban hordozó plazmidokkal végzett komplementációs kísérletekben kimutattuk, hogy az aktív peptid mérete az N-terminális 96. aminosaváig csökkenthető. Ezek az adatok bizonyították, hogy a PP2982 törzs egy aktív N-terminális CycH alegységet termel, mely a C-terminális szakasz



jelenléte nélkül is képes meghatározott funkciókat ellátni. Hasonló adatokat korábban *Bradyrhizobium japonicum*-ban (Ritz és mtsai. 1993), *Rhodobacter capsulatus*-ban (Lang és mtsai. 1996) valamint *Rhizobium etli*-ben (Reyes és mtsai. 2000) írtak le. Az irodalmi adatok szerint a fehérje N-terminális (periplazmatikus rész előtti szakasza) elegendő volt ahhoz, hogy a  $bc_1$  komplexben szereplő  $c_1$  citokróm létrejöhessen. *Rhizobium leguminosarum cyc* mutánsaiban Yeoman és mtsai. (1997) PPIX felhalmozódást tapasztaltak. A *cycH* mutáns törzsben (A267) levő Tn5 inszerció a fehérje citoplazmatikus hurkát kódoló részben található, akárcsak a *S. meliloti* AT342 törzsben.

Feltételezéseink szerint az N-terminális 96 aminosavból álló CycH fehérje szakasznak három szerepe lehet. Egyrészt a 96 aminosav hosszúságú polipeptid elegendő lehet ahhoz, hogy a többi Cyc fehérjével együtt létrehozzon egy komplexet, mely a PPIX felhasználáshoz szükséges. Lehetséges azonban, hogy így csupán instabil *c*-típusú citokrómok képződnek, mivel a PP2982 törzsben egyetlen citokróm jelenlétét sem tudtuk kimutatni (11. ábra). A második feltételezett szerep a protohem IX (hemB) periplazmába történő transzportjában lehet. A protohem IX-nek ugyanis át kell jutnia a citoplazmából a periplazmába ahhoz, hogy rákapcsolódjon az apoproteinre. Eddigi irodalmi adatok szerint a hem csoport citoplazmából periplazmába történő transzportja még nem ismert. *Escherichia coli*-ban a CcmC fehérjéről bizonyították, hogy felelős a hemnek a CcmE (CycJ) fehérjére való jutásáért (Schulz és mtsai. 1999), és azt feltételezték, hogy transzmembrán fehérjeként szerepet játszhat a hem membránon keresztüli transzportjában is. Ezt a feltételezést azonban kísérleti adatok nem támasztják alá. Munkánk során a *S. meliloti* kromoszómáján azonosítottunk egy olyan gént, mely a CcmC-vel homológ fehérjét kódol (SMc 03849), és tartalmazza azt a His-60-at és His-184-et, valamint egy triptofánban gazdag motívumot, melyekről bizonyították, hogy a CcmC és CcmE közti interakcióban fontos szerepet

játszanak (Ren és Thöny-Meyer 2001). A *S. meliloti*-ban azonosított CcmC-vel homológ fehérje funkciójáról nincsenek kísérleti adatok, azonban eredményeink a CychH fehérjének a hem periplazmába történő transzportjában játszott szerepét valószínűsítik. Másrészt Miyamoto és mtsai. (1992) *Escherichia coli visA (hemH)* mutánsban kapott adatai alapján egy további funkció feltételezhető. Az *Escherichia coli visA* mutáns nem termelt ferrokelatázt, és a baktériumokban a PPIX felhalmozódott. A ferrokelatáz enzim feladata az, hogy a redukált vas atomot beépítse a PPIX porfirin vázába. Dailey és mtsai. (2000) szerint, számos baktérium fajban, köztük *Bradyrhizobium japonicum*-ban is a ferrokelatáz enzim membrán asszociált monomer. Saját eredményeinket ezen adatokkal összevetve a legvalószínűbb funkciónak azt tartjuk, hogy a hem szintézis folyamatában a CychH fehérje kölcsönhatásba lép a ferrokelatázzal, és ehhez az N-terminális polipeptidszakasz elegendő. A CychH fehérje e részének hiányában a ferrokelatáz működésképtelen, és így a PPIX felhalmozódik.

## **6.2. A CychH fehérje C-terminális részének szerepe a c-típusú citokrómok biogenezisében**

A PP2982 *cychH* mutáns törzsben, ahol a CychH fehérje C-terminális része hiányzik, a PPIX szint ugyanolyan alacsony, mint a vad típusú baktériumokban, ám a c-típusú citokrómok hiánya arra utal, hogy a fehérje C-terminális szakasza lényeges szerepet tölt be a teljes biológiai funkciójában. A fehérje e szakaszának aminosav szekvenciáját vizsgálva három tetratrikopeptid (TPR) domént azonosítottunk (12. ábra, 15. ábra). A 34 aminosavból álló TPR doméneket először az élesztő sejtciklusát szabályozó Cdc23p fehérjében írták le (Lamb és mtsai. 1994). A későbbiekben számos más fehérjében is azonosították őket. Az első, *Rhizobium* fajból izolált TPR domén tartalmú fehérje a Cya3 adenilát cikláz volt (Sharypova és mtsai. 1999). E motívumok funkciója az, hogy fehérjék között interakciókat létesítsenek. A TPR domének három

dimenziós szerkezetének vizsgálatából kiderült, hogy két antiparallel  $\alpha$ -hélixet tartalmaznak, oly módon, hogy a tandem elrendeződésű TPR motívumok egy csatornát közrezáró, jobbra csavaródó helikális struktúrát képeznek, melyben a target fehérjék komplementer régiója elhelyezkedhet (Blatch és mtsai. 1999). Komplementációs kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a TPR doménnel homológ fehérje szakaszok a CycH mely funkciójában játszhatnak szerepet. A három domént egyenként eltávolítva azt tapasztaltuk, hogy mindhárom TPR motívum nélkülözhetetlen a fehérje *c*-típusú citokrómok biogenezisében játszott szerepének betöltéséhez, ugyanis sem a nitrát redukcióhoz, sem pedig a nitrogénkötéshez szükséges citokróмокat nem lehetett kimutatni a baktérium sejtekben. A TPR doméneket más fajok CycH-val homológ fehérjeiben is megtaláltuk (13. ábra). Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a TPR domének a CycH fehérjében fontos szerepet töltenek be a CycH-nak az apoproteinnel és/vagy a többi citokróm *c* hem liáz komponenssel kialakított kapcsolatában a *c*-típusú citokrómok biogenezise során.

### **6.3. A *cycH* mutánsok Rnr<sup>-</sup> és Fix fenotípusának komplementálása különböző genetikai elemeket igényel**

A *cycH* gént hordozó pGC292 plazmid mindkét *cycH* mutáns Rnr<sup>-</sup> fenotípusát komplementálja. A Fix<sup>-</sup> fenotípus helyreállításához azonban a *cycJ* génre is szükség van (16. ábra). E jelenséget egyrészt azzal magyarázhatjuk, hogy a *cycH* mutáns törzsekben (AT342 és PP2982) levő Tn5 inszercióknak ugyan nincs poláris hatása, de jelenlétük csökkentheti a mögöttük levő gének átíródását például azért, mert a Tn5 „inverted repeat” szekvenciájában feltételezett másodlagos promoterről kevésbé hatékony a transzkripció. Valószínűleg ez az oka annak, hogy szükség van még egy addicionális *cycJ* génkópiára a Fix fenotípus helyreállításához. Érdekes módon a másik két gén, a *cycK* és *cycL* jelenléte plazmidon már nem szükséges. Hasonló

megfigyeléseket eddigi irodalmi adatokban nem találtunk. Egy másik elképzelhető lehetőség az, hogy egy hosszabb mRNS nagyobb stabilitást biztosít, és ezáltal hatékonyabb a CycH transláció.

Egy csonka *S. meliloti cycH* gén, a 309 aminosav hosszúságú C-terminális szakasz nélkül elegendő volt az AT342 törzs Rnr fenotípusának a komplementálásához (13. ábra). Page és Ferguson 1995-ben hasonló eredményt közöltek *Paracoccus denitrificans*-ban, ugyanis a 317 aminosavból álló Cych a C-terminális 96 aminosav hiányában is működőképes volt azon *c*-típusú citokrómok biogenezisében, melyek e baktériumok metilotróf és anaerob növekedését teszik lehetővé. Ha a *S. meliloti* 309 aminosavat kódoló csonka *cycH* génje mögé beépítettük a teljes *cycJ*-t is, és az így kapott konstrukciót bevittük az AT342 mutáns törzsbe, az Rnr fenotípussal ellentétben a Fix fenotípus nem állt helyre. Azt feltételezzük, hogy a csupán 309 aminosavból álló Cych fehérje elegendő azon *c*-típusú citokrómok szintéziséhez, melyek a nitrát redukcióhoz szükségesek, azonban azok a *c*-típusú citokrómok, melyek a nitrogénkötéshez nélkülözhetetlenek, már nem szintetizálódnak. Ilyen például a jól ismert FixO és FixP mono- és dihem *c*-típusú citokróm, mely alkotórésze a szimbiózis-specifikus terminális oxidáz komplexnek (Preisig és mtsai. 1993). A FixO és FixP fehérjék mikroaerob körülmények között nagy mennyiségben termelődnek és fontos szerepet töltenek be a légzésben. Elképzelhető, hogy a Cych C-terminális részén különböző fehérje szakaszok játszanak szerepet a különböző struktúrájú apoproteinekkal való kapcsolatteremtésben.

#### **6.4. A *cyc* operon mikroaerob indukciójának szabályozása**

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a *c*-típusú citokrómok biogenezisében résztvevő *cyc* operon kifejeződése megnövekedett a szimbiotikus körülményekhez hasonló mikroaerob környezetben.

A *S. meliloti*-ban az alacsony oxigénkoncentrációnál bekövetkező transzkripció szabályozást irányító FixL/J kétkomponensű jelátvivő rendszernek nincs szerepe a *cyc* operon mikroaerob indukciójában. A feltételezett oxigén szenzor szerepet betöltő FixK fehérje sem indukálja a *cyc* operon kifejeződését. Irodalmi adatok szerint a *S. meliloti* ActS/R rendszer az alacsony pH szintek érzékeléséért felelős (Tiwari és mtsai. 1996), az általa szabályozott gének azonban még ismeretlenek. Az ActS/R rendszert alkotó fehérjék homológjai más fajokban az alacsony oxigénszint érzékelését és a keletkezett jel továbbítását végzik. Így például a *Bradyrhizobium japonicum*-ban leírt RegS/R rendszer a FixL/J rendszer mellett fontos szerepet tölt be a nitrogénkötési gének mikroaerob indukciójában (Sciotti és mtsai. 2003). Emmerich és mtsai. (2000a) bizonyították, hogy a *S. meliloti* ActR fehérjéje képes helyettesíteni a RegR fehérjét *Bradyrhizobium japonicum*-ban. A *cyc* operon promóterében talált RegR-kötő motívummal homológ szekvencia megerősíti azt a feltételezésünket, mely szerint valószínűleg az ActS/R rendszeren keresztül érkezik az alacsony oxigénkoncentráció jele a *cyc* operonhoz. Tiwari és mtsai. (1996) az ActS/R szenzor-regulátor rendszernek az oxigénszintet érzékelő rendszerekkel való homológiáját megfigyelve már feltételezték, hogy az ActS/R képes lehet mind az alacsony pH, mind pedig az alacsony oxigénszintek érzékelésére és közvetítésére. A *cycH-lacZ* fúzióval  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásméréseken alapuló eredményeink azt mutatják, hogy az ActS/R kétkomponensű jelátvivő rendszer alacsony oxigénkoncentráció esetén hatással van a *cyc* operon kifejeződésére. A szabadon élő *actR* mutáns baktériumokban a *cyc* operon kifejeződése nem indukálódott mikroaerob körülmények között (19. ábra). A lucerna gümőből mért aktivitás értékekből pedig kiderült, hogy az intenzív nitrogénkötést végző gümők esetében a *cyc* gének kifejeződésére pozitív hatással van az ActR fehérje, ugyanis az *actR* mutánsokkal inokulált gümőkben a vad típushoz képest 25%-al alacsonyabb aktivitást mértünk (20. ábra). Az ActR

fehérje funkciójára a végső bizonyítékot az ActR-*cyc* promóter kölcsönhatás molekuláris biológiai kimutatása fogja szolgáltatni.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Physiol* 35:443-478
- Alting-Mees MA, Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 17:9494
- Batut J, Terzaghi B, Ghérardi M, Huguet M, Terzaghi E, Garnerone AM, Boistard P, Huguet T (1985) Localization of symbiotic *fix* region on *Rhizobium meliloti* pSym megaplasmid more than 200 kilobases from the *nod-nif* region. *Mol Gen Genet* 199:232-239
- Batut J, Daveran-Mingot ML, David M, Jacobs J, Garnerone AM, 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
- Bauer E, Kaspar T, Fischer HM, Hennecke H (1998) Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR. *J Bacteriol* 180:3853-3863
- Bánfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi Á (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318-325
- Blatch GL, Lassle M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939
- Bott M, Thöny-Meyer L, Loferer H, Rossabach S, Tully RE, Keister D, Appleby CA, Hennecke H (1995) *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome *c<sub>550</sub>* is required for nitrate respiration but not for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 177:2214-2217

- Cinege G, Kereszt A, Kertész S, Balogh G, Dusha I (2004) The roles of different regions of the CycH protein in *c*-type cytochrome biogenesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Genet Genomics* 271:171-179
- Corbin D, Barran L, Ditta G (1983) Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3005-3009
- Dailey HA, Dailey TA, Wu CK, Medlock AE, Wang KF, Rose JP, Wang BC (2000) Ferrochelatase at the millenium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell Mol Life Sci* 57:1909-1926
- Dalbey RE, von Heijne G (1992) Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 17:474-478
- David M, Daveran ML, Batut J, Dedieu A, Domergue O, Ghai J, Hertig C, Boistard P, Kahn D (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54:671-683
- Delgado MJ, Jeoman KH, Wu G, Vargas C, Davies AE, Poole RK, Johnston AWB, Downie JA (1995) Characterization of the *cycHJKL* genes involved in cytochrome *c* biogenesis and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 177:4927-4934
- Delgado MJ, Bedmar EJ, Downie A (1998) Genes involved in the formation and assembly of Rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv Microb Physiol* 40:191-231
- DeShazer D, Woods DE (1996) Broad-host-range cloning and cassette vectors based on the R388 trimethoprim resistance gene. *Bio Techniques* 20:762-764
- Deshmukh M, Brasseur G, Daldal F (2000) Novel *Rhodobacter capsulatus* gene required for the biogenesis of various *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol* 35:123-138



- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 77:7347-7351
- Emmerich R, Hennecke H, Fischer HM (2000) Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in  $\alpha$ -Proteobacteria. Arch Microbiol 174:307-313
- Emmerich R, Strehler P, Hennecke H, Fischer HM (2000) An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. Nucleic Acids Res 28:4166-4171
- Enggist E, Schneider MJ, Thöny-Meyer L (2003) Biochemical and mutational characterization of the heme chaperone CcmE reveals a heme binding site. J Bacteriol 185:175-183
- Élő P, Semsey S, Kereszt A, Nagy T, Papp P, Orosz L (1998) Integrative promoter cloning plasmid vectors for *Rhizobium meliloti*. FEMS Microbiol Lett 159:7-13
- Fenner BJ, Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ, Glenn AR (2000) ActR is a global genetic regulator in *Sinorhizobium meliloti*. In: Pedrosa FO, Hungria M, Yares G, Newton WE (eds) Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer, London, pp: 89-90
- Fischer HM (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol Rev 58:352-386
- Gabblert KK, Goldmann BS, Kranz RG (1997) Differential levels of specific cytochrome *c* biogenesis  $\square$ nt he $\square$  sin response to oxygen: analysis of the *ccl* operon in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol 179:5422-5428
- Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G (1993) Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. J Biol Chem 268:16293-16297

- Godfrey CA, Dilworth MJ (1971) Haem biosynthesis from [<sup>14</sup>C]- $\delta$ -aminolevulinic acid in laboratory grown and root nodule *Rhizobium lupini*. J Gen Microbiol 69:385-390
- Goldman BS, Beckman DL, Bali A, Monika EM, Gabbert KK, Kranz RG (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. J Mol Biol 268:724-738
- Griffiths L, Cole JA (1987) Lack of redox control of the anaerobically-induced *nirB*<sup>+</sup> gene of *Escherichia coli* K-12. Arch Microbiol 147:364-369
- Grove J, Busby S, Cole J (1996) The role of the genes *nrfEFG* and *ccmFH* in cytochrome *c* biogenesis in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 252:332-341
- Györgypál Z, Kiss GB, Kondorosi Á (1991) Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD protein. Bio Essays 13:575-581
- Hirsch PR, Beringer JE (1984) A physical map of the pPH1JI and pJB4JI. Plasmid 12:139-141
- Jording D, Uhde C, Schmidt R, Pühler A (1994) The C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport system of *Rhizobium meliloti* and its role in nitrogen fixation during symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*). Experientia 50:874-883
- Kahn D, Davis M, Domergue O, Daveran M, Ghai J, Hirsch PR, Batut J (1989) *Rhizobium meliloti* *fixGHIS* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. J Bacteriol 171:929-939
- Karls RK, Wolf JR, Donohue TJ (1999) Activation of the *cycA* P2 promoter from the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c*<sub>2</sub> gene by the photosynthesis response regulator. Mol Microbiol 34:822-835

- Kereszt A, Slaska-Kiss K, Putnokoy P, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1995) 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
- Kim J, Rees DC (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33:389-397
- Kiss GB, Vincze É, Kálmán Z, Forrai T, Kondorosi Á (1979) Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J Gen Microbiol* 113:105-111
- Kondorosi Á, Barabás I, Sváb Z, Orosz L, Sík T, Hotchkiss RD (1973) Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti* *Nat New Biol* 246: 153-154
- Kondorosi É, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol Gen Genet* 193:445-452
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lamb JR, Michaud WA, Sikorski RS, Hieter PA (1994) Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J* 13:4321-4328
- Lamb JR, Tugeudreich S, Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20:257-259
- Lang SE, Jenney FE, Daldal F (1996) *Rhodobacter capsulatus* CychH: a bipartite gene product with pleiotropic effects on the biogenesis of structurally different *c*-type cytochromes. *J. Bacteriol.* 178:5279-5290
- Leong S, Williams P, Ditta G (1985) Analysis of the 5' regulatory region of the gene for aminolevulinic acid of *Rhizobium meliloti* . *Nucleic Acids Res* 13:5965-5976

- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 22:722-726
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook JE (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Mandon K, Kaminski PA, Elmerich C (1994) Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J Bacteriol* 176:2560-2568
- Masuda S, Matsumoto Y, Nagashima KVP, Shimada K, Inoue K, Bauer CE, Matsuura K (1999) Structural and functional analysis of photosynthetic regulatory genes *regA* and *regB* from *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter denitrificans*, and *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 181:4205-4215
- Miller JM (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, Ny
- Mitchell P (1991) Foundation of vectorial metabolism and osmochemistry. *Biosci Reps* 11:297-346
- Miyamoto K, Nishimura K, Masuda T, Tsuji H, Inokuchi H (1992) Accumulation of protoporphyrin IX in light sensitive mutants of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 310:246-248
- Monika EM, Goldman BS, Beckman DL, Kranz RG (1997) A thioreduction pathway tethered to the membrane for periplasmic cytochromes *c* biogenesis, *in vitro* and *in vivo* studies. *J Mol Biol* 271:679-692
- Niel C, Guillaume JB, Bechet M (1977) Demonstration of 2 enzymes with  $\beta$ -galactosidase activity in *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol* 23:1178-1181

- O'Brian MR (1996) Heme synthesis in the *Rhizobium*-legume symbiosis: a palette for bacterial and eukaryotic pigments. *J Bacteriol* 178:2471-2478
- Olah B, Kiss E, Györgypál Z, Borzi J, Cinege G, Csanádi G, Batut J, Kondorosi Á, Dusha I (2001) Mutation on the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:887-894
- Page MD, Ferguson SJ (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*<sub>1</sub>. *Mol Microbiol* 15:307-318
- Pearce DA, Page MD, Norris HAC, Tomlinson EJ, Ferguson SJ (1998) Identification of the contiguous *ccmF* and *ccmH* genes: disruption of *ccmF*, encoding a putative transporter, results in formation of an unstable apocytochrome *c* and deficiency in siderophore production. *Microbiology* 144:467-477
- Pettigrew GW, Moore GR (1987) Cytochrome *c*. Biological aspects. Springer Verlag KG, Berlin, Germany
- Poole RK (1988) Bacterial cytochrome oxidases. Energy transduction in bacteria. Academic Press London pp:231-291
- Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for nitrogen-fixing symbiosis *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3309-3313
- Ramseier TM, Winteler HV, Hennecke H (1991) Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes. *J Biol Chem* 266:7739-7803
- Ren Q, Thöny-Meyer L (2001) Physical interaction of CcmC with heme and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem* 276:32591-32596

- Ren Q, Ahuja U, Thöny-Meyer L (2002) A bacterial cytochrome *c* heme lyase. *J Biol Chem* 277:7657-7663
- Reyes DJ, Tabche ML, Morera C, Girard ML, Romero D, Krol E, Miranda J, Soberon M (2000) Expression pattern of *Rhizobium etli* *ccmJEFH* genes involved in *c*-type cytochrome maturation. *Gene* 250:149-157
- Rhijn P, Vanderleyden J (1995) The *Rhizobium*-Plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124-142
- Ritz D, Bott M, 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, Hennecke H (1995) The *cycHJKL* gene cluster plays an essential role in the biogenesis of *c*-type cytochromes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet* 47:27-38
- Rossbach S, Loferer H, Acuna G, Appleby CA, Hennecke H (1991) Cloning, sequencing and mutational analysis of the cytochrome *c*<sub>552</sub> gene (*cycB*) from *Bradyrhizobium japonicum* strain 110. *FEMS Microbiol Lett* 67:145-52
- Rostás K, Kondorosi É, Horváth B, Simoncsits A, Kondorosi Á (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1757-1761
- Sambongi Y, Stoll R, Ferguson SJ (1996) Alteration of haem-attachment and signal cleavage sites for *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*<sub>552</sub> probes pathway of *c*-type cytochrome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 19:1193-1204
- Schulz H, Fabianek RA, Pelliccioli EC, Hennecke H, Thöny-Meyer L (1999) Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6462-6467

- Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi É, Virelizier H, Glushka JN, Endre G Gero SD, 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
- Schulz H, Pelliccioli EC, Thöny-Meyer L (2000) New insights into the role of CcmC, CcmD and CcmE in the haem delivery pathway during cytochrome *c* maturation by a complete mutational analysis of the conserved tryptophan-rich motif of CcmC. Mol Microbiol 37:1379-1388
- Schlüter A, Ruberg S, Kramer M, Weidner S, Priefer UB (1995) A homolog of the *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation gene *fixN* is involved in the production of a microaerobically induced oxidase activity in the phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 247:206-15
- Schlüter A, Patschkowski T, Quandt J, Selinger LB, Weidner S, Kramer M, Zhou L, Hynes MF, Priefer UB (1997) Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39. Mol Plant Microbe Interact 10:605-16
- Sciotti MA, Chanfon A, Hennecke H, Fischer HM (2003) Disparate oxygen responsiveness of two regulatory cascades that control expression of symbiotic genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 185:5639-5642
- Sharypova LA, Yurgel SN, Keller M, Simarov BV, Pühler A, Becker A (1999) The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, transcriptional regulator and an adenylate cyclase. Mol Gen Genet 261:1032-1044

- Soupène E, Foussard M, Boistard P, Thouchet G, Batut J (1995) Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N<sub>2</sub>-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. Proc Natl Acad Sci USA 92:3759-3763
- Spiro S, Guest JR (1987) Activation of the lac operon of Escherichia coli by a mutant FNR protein. Mol Microbiol 1:53-58
- Tabche ML, Garcia EG, Miranda J, Escamilla JE, Soberon M (1998) *Rhizobium etli* *cycHJKL* gene locus involved in *c*-type cytochrome biogenesis: sequence analysis and characterization of two *cycH* mutants. Gene 208:215-219
- Thöny-Meyer L, Stax D, Hennecke H (1989) An unusual gene cluster for the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. Cell 57:683-697
- Thöny-Meyer L, Ritz D, Hennecke H (1994) Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. Mol Microbiol 12:1-9
- Thöny-Meyer L (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 61:337-376
- Thöny-Meyer L (2002) Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task? Biochem Soc Trans 30: 633-638
- Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ, Glenn AR (1996) Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two component sensor-regulator system. Microbiology 142:1693-1704
- Tully RE, Sadowsky MJ, Keister DL (1991) Characterization of cytochromes c550 and c555 from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, mutagenesis, and sequencing of the c555 gene (*cycC*). J Bacteriol 173:7887-7895



- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172:4285-4306
- Verma DPS (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4:373-382
- Werner D (1992) Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. In Stacey G, Burris RH, Evans HJ, Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York p:399-431
- Yeoman KH, Delgado MJ, Wexler M, Downie JA, Johnston AWB (1997) High affinity iron acquisition in *Rhizobium leguminosarum* requires the *cycHJKL* operon and the *feuPQ* gene products, which belong to the family of two-component transcriptional regulators. *Microbiology* 143:127-134

## TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A dolgozat készítéséhez felhasznált tudományos publikáció

**Cinege G**, Kereszt A, Kertész S, Balogh G, Dusha I (2004) The roles of different regions of the CysH protein in *c*-type cytochrome biogenesis in *Sinorhizobium meliloti*. Mol Genet Genomics 271:171-179

### A dolgozat készítésekor nem használt tudományos publikáció

Oláh B, Kiss E, Györgypál Z, Borzi J, **Cinege G**, Csanádi G, Batut J, Kondorosi Á, Dusha I (2001) Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. Mol Plant Microbe Interact 14:887-894

## ÖSSZEFOGLALÁS

A *Sinorhizobium meliloti* talajbaktériumok a lucernával szimbiotikus kölcsönhatást alakítanak ki, melynek során a lucerna gyökerein létrejött gümőkben a bakteroidok a légköri nitrogént ammóniává redukálják. A nitrogénkötéshez szükséges nagymennyiségű energiát egy szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc biztosítja, melynek nagy oxigén-affinitású terminális oxidáza *c*-típusú citokrómokat tartalmaz. A *c*-típusú citokrómok minden élő szervezetben fontos szerepet töltenek be. Legjelentősebb funkciójuk mindenütt a légzési elektrontranszport folyamatokban van. *S. meliloti* baktériumokkal végzett kísérletek kimutatták, hogy a *c*-típusú citokrómok biogenezisében hibás mutánsok nem képesek a légköri nitrogén megkötésére.

A *c*-típusú citokrómok két komponensből állnak: a hem prosztetikus csoportból és a citokróm apoproteinből. E két komponens kovalensen kapcsolódik egymáshoz. A kovalens összekapcsolást a citokróm *c* hem liáz komplex (CCHL) alegységei, a CycH, CycJ, CycK és CycL fehérjék végzik a membrán periplazmatikus oldalán. A CycH fehérje funkciója az, hogy a citokróm biogenezis során az apoproteint megfelelő konformációban tartsa, a CycJ, CycK és CycL fehérjék pedig a hem csoportot továbbítják a periplazmában, és hozzájárulnak a hemnek az apoproteinre való kapcsolásához. A Cyc fehérjék funkciója azonban még nem teljesen ismert. Jelenleg számos laboratóriumban, különböző baktérium fajokon végeznek kutatásokat azért, hogy a Cyc fehérjék pontos szerepe ismertté váljon.

### Célkitűzések

Munkánk célja az volt, hogy a *S. meliloti* nitrogénkötő baktériumban a Cyc fehérjéknek a *c*-típusú citokrómok biogenezisében betöltött funkcióját megismerjük a szimbiózisra jellemző

mikroaerob körülmények között. Megvizsgáltuk továbbá a Cyc fehérjét kódoló operon transzkripció szabályozásának változását az oxigénszint csökkenésének hatására. A következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen hatással van a Cyc fehérjék hiánya a hem bioszintézisre?
2. Mi a magyarázata a két *cycH* mutáns törzsben (AT342 és PP2982) található Tn5 inszerció különböző hatásának?
3. Mekkora az a minimális N-terminális CycH fehérje szakasz, mely biztosítja az alacsony protoporfirin IX (PPIX) szint megőrzését?
4. Milyen funkciókat lát el a CycH fehérje C-terminális periplazmatikus szakasza a *c*-típusú citokrómok biogenezisében?
5. Mivel egyes *c*-típusú citokrómok csupán szimbiotikus körülmények között szintetizálódnak, vizsgáltuk, hogy megnövekszik-e a *cycHJKL* operon kifejeződése mikroaerob körülmények között?
6. Melyek azok a fehérjék, amelyek szerepet játszanak a *cycHJKL* operon mikroaerob indukciójában?

## Eredmények

A *cycHJKL* génekben mutációt hordozó *S. meliloti* baktériumokkal végzett kísérleteink során kiderült, hogy a Cyc fehérjék hiánya nemcsak nitrogénkötésben (Fix<sup>-</sup>) és nitrát redukcióban (Rnr<sup>-</sup>) hibás fenotípust okoz, hanem a hem bioszintézis utolsó lépéseit is befolyásolja. A *cyc* mutánsokban (a PP2982 *cycH* mutáns törzs kivételével) a vad típushoz képest felhalmozódott a hem közvetlen prekursora, a PPIX. Ennek oka valószínűleg az, hogy a Cyc fehérjék hiányában nem alakulhat ki a hem és az apoprotein közti kovalens kötés. Komplementációs kísérletek

segítségével megállapítottuk, hogy a munkánk során vizsgált két *cycH* mutánsban az eltérő PPIX fenotípus nem magyarázható a transzpozon beépülésének esetleges poláris hatásával. A különbséget a két mutánsban az idézte elő, hogy bennük a CycH fehérjének különböző hosszúságú szakaszai szintetizálódtak, amely a PP2982 törzsben elegendő volt az alacsony PPIX szint megőrzéséhez. Megállapítottuk, hogy az aktív peptid az N-terminális 96 aminosavból áll, és magában foglalja a CycH fehérje első transzmembrán doménjét a citoplazmatikus hurokkal. Eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve az N-terminális 96 aminosavból álló CycH fehérje szakasznak három lehetséges szerepét feltételeztük. Egyrészt e fehérje szakasz a CycJ, CycK és CycL fehérjékkel együtt elegendő lehet instabil *c*-típusú citokrómok biogeneziséhez, így a PPIX felhasználódáshoz. Egy másik lehetséges funkció a hem csoport periplazmába történő transzportja. Amennyiben a hem szállítás zavartalan, nem halmozódik fel a PPIX. A harmadik feltételezett funkció szerint a CycH fehérjének ez a szakasza kölcsönhatásba léphet a PPIX-ből hemet szintetizáló ferrokelatáz enzimmel, és elősegítheti annak működését.

A CycH fehérje C-terminális periplazmatikus szakaszát vizsgálva három tetra-trikopeptid (TPR) domént azonosítottunk. A TPR domének funkciója irodalmi adatok alapján ismert, fehérje-fehérje interakciókban játszanak szerepet. Kísérleteink során olyan konstrukciókat készítettünk, melyekből egyenként eltávolítottuk a *cycH* gén TPR doméneket kódoló szakaszait. Ezekkel komplementációs kísérleteket végeztünk és kimutattuk, hogy a TPR domének nélkülözhetetlenek a CycH fehérje funkciójának a betöltéséhez. Hiányukban sem a  $\text{Fix}^+$ , sem a  $\text{Rnr}^+$  fenotípus nem állítható helyre. Azt feltételezzük, hogy a CycH fehérje esetében a TPR domének a fehérjének az apoproteinnel és/vagy a citokróm *c* hem liáz komplex többi egységével való kapcsolatát biztosítják.

További munkánk során abból indultunk ki, hogy a szimbiózis-specifikus légzési elektrontranszport lánc nagy oxigén-affinitású terminális oxidázát kódoló *fixNOQP* operon mikroaerob körülmények között fejeződik ki. A keletkezett termékek között a FixO és FixP fehérje c-típusú citokróm apoprotein. Megvizsgáltuk, hogy a *cycHJKL* operon transzkripciója is oxigén kontrol alatt áll-e. Megállapítottuk, hogy mikroaerob környezetben a *cycHJKL* operon kifejeződése megnövekedett, tehát feltételezhetően szimbiotikus körülmények között a Cyc fehérjék nagyobb mennyiségben képződnek. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *S. meliloti*-ban ismert, oxigénszintet érzékelő és e jelet továbbító fehérjéknek van-e szerepe a *cyc* operon mikroaerob indukciójában. Eredményeink alapján kizártuk a FixL, FixJ valamint FixK fehérjék szerepét e folyamatban. Harmadik jelöltünk az ActS/R kétkomponensű jelátvivő rendszer volt. Eredményeink szerint az ActR fehérje mikroaerob környezetben és intenzív nitrogénkötés folyamata alatt szerepet játszik a *cyc* operon kifejeződésének indukciójában.

## SUMMARY

The soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* is able to form symbiotic interaction with the host plant alfalfa, and to fix atmospheric dinitrogen in the nodules formed on the roots of the host plant. Nitrogen fixation is an energetically expensive procedure. The required energy is provided by a symbiosis-specific electron transport chain, which comprises a terminal electron acceptor with high oxygen affinity. This terminal oxidase contains *c*-type cytochromes. *c*-type cytochromes fulfil important functions in all organisms, having the main role in the respiratory electron transport chains. Previous experiments showed that *S. meliloti* mutants defective in the biogenesis pathway of *c*-type cytochromes are not able to fix nitrogen.

The *c*-type cytochromes are assembled from two subunits: the apoprotein and the heme prosthetic group. Their covalent binding is generated on the periplasmic side of the membrane by the function of a cytochrome *c* heme lyase complex (CCHL), containing the CycH, CycJ, CycK and CycL proteins. Previous experiments demonstrated that the role of the CycH protein is to bind the apoprotein and keep it in an appropriate conformation for its assembly with the heme group. The CycJ, CycK and CycL proteins are involved in the periplasmic transport of the heme group and its binding to the apoprotein. The exact mechanism of the function of Cyc proteins is not known. Intensive research work is carried out in many laboratories on different bacterial species to better understand the molecular mechanism of the functions of Cyc proteins.

### Aims

The aim of our work was to investigate the role of the Cyc proteins in the *c*-type cytochrome biogenesis under microaerobic conditions, characteristics for the symbiotic

environment. Furthermore, we studied the effect of microoxic conditions on the expression of the *cycHJKL* operon. Therefore, we aimed to answer the following questions:

1. Is the heme biosynthetic pathway affected by the absence of Cyc proteins?
2. What is the explanation for the different effects of Tn5 transposons in two independent insertion mutants (AT342 and PP2982) on the downstream *cycJKL* genes?
3. Which is the shortest N-terminal Cych protein region, able to maintain the low protoporphyrin IX (PPIX) level?
4. What is the role of the C-terminal periplasmic part of the Cych protein?
5. Certain *c*-type cytochromes are produced exclusively under microoxic conditions. We examined whether these conditions induced the expression of the *cycHJKL* operon as well.
6. Which are the regulatory proteins responsible for the microaerobic transcriptional induction of *cycHJKL* operon?

## Results

Experiments with *S. meliloti* strains carrying mutations in the *cycHJKL* operon revealed that the absence of the Cyc proteins resulted in strains deficient in nitrogen fixation and nitrate reduction ability, and in addition, the late steps of the heme biosynthetic pathway were also affected in these derivatives. In the *cyc* mutants (except for the strain PP2982) the immediate heme precursor (PPIX) accumulated compared to the wild-type strain. The accumulation of PPIX was probably due to the fact that in the absence of the Cyc proteins, heme could not be transported in the periplasm and bound to the apoprotein. The different PPIX phenotypes of the two *cycH* mutants AT342 and PP2982 could not be explained by a differential effect of the two Tn5 insertions on the transcription of downstream *cyc* genes. None of the Tn5 insertions had



polar effects on the expression of the *cycJ*, *K* or *L* genes. By using a series of plasmids carrying deletion derivatives of *cycH*, we demonstrated in complementation experiments that the N-terminal 96 amino acids of CycH protein, including its first transmembrane domain and the cytoplasmic loop, were in fact sufficient to rescue the PPIX phenotype. Comparing our results with earlier data we hypothesized three possible functions of the N-terminal 96 amino acids of CycH. First, it is conceivable that this fragment is sufficient to form a complex together with the other Cyc proteins, and the formation of the complex is required for the consumption of PPIX. Another possible role of the truncated CycH protein could be to support heme transport to the periplasm, hence in its presence the PPIX can not accumulate. The N-terminal 96 amino acids of CycH may also be involved in the interaction with the ferrochelatase enzyme, which is responsible for inserting the reduced ferric ion into the porphyrin ring of PPIX. In the absence of this CycH region, ferrochelatase may not be functional and PPIX accumulates.

Analysis of the amino acid sequence of the C-terminal periplasmic part of CycH revealed three TPR domains. The function of these motifs is to promote protein-protein interactions between the TPR-containing protein and one or more non-TPR proteins. We analysed the role of these domains with complementation experiments, using plasmids, which code for CycH proteins lacking the first, second or third TPR domain, and demonstrated that all three TPRs are essential for the function of the protein. In their absence neither the  $\text{Fix}^+$  nor the  $\text{Rnr}^+$  phenotypes could be recovered. We suppose that the TPR domains in CycH have an essential role in the interactions with the apoprotein and/or the other members of cytochrome *c* heme lyase complex during cytochrome *c* biogenesis.

The transcription of the *fixNOQP* operon, coding for the subunits of the symbiosis-specific terminal oxidase complex, is induced microaerobically. The produced FixO and FixP

proteins are *c*-type cytochrome apoproteins. We investigated whether the expression of the *cycHJKL* operon is also under the control of oxygen, and we found that its expression increased under microaerobiosis. We studied whether *S. meliloti* regulatory proteins known to be involved in sensing the oxygen level may have a role in the microaerobic induction of the *cyc* operon. Our data showed that FixL, FixJ and FixK proteins are not involved in this function. The results obtained with the ActS/R two component regulatory system demonstrated that the ActR protein had a role in activating the transcription of the *cyc* operon under microaerobiosis, and under conditions of intensive nitrogen fixation.