

Ph.D. értekezés tézisei

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

Készítette: Cinege Gyöngyi

Témavezető: Dr. Dusha Ilona

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

2004

Bevezetés

A *Sinorhizobium meliloti* talajbaktériumok a lucernával szimbiótikus 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 alegységből állnak: a hem prosztetikus csoportból és a citokróm apoproteinből. E két alegység 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 biogenezésében betöltött funkcióját megismerjük a szimbiózisra jellemző mikroaerob körülmények között. Megvizsgáltuk továbbá a Cyc fehérjéket kódoló operon transzkripciós 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 szimbiótikus 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?

Alkalmazott módszerek

Molekuláris biológiai módszerek: DNS, RNS és fehérje izolálás, elektroforézis, Southern-analízis, Northern-analízis, polimeráz láncreakció, klónozás, szekvencia analízis, homológ rekombináció.

Mikrobiológiai módszerek: konjugáció, transzformáció, fág transzdukció.

Biokémiai módszerek: β -galaktozidáz aktivitás meghatározás, *c*-típusú citokrómok kimutatása, protoporfirin IX kimutatása, „respirációs” nitrát reduktáz aktivitás kimutatása.

Medicago sativa növények laboratoriumi körülmények közti termesztése, baktériumokkal való inokulálása.

Eredmények és következtetések

A *cycHJKL* génekben mutációt hordozó *S. meliloti* baktériumokkal végzett kísérleteink során kiderült, hogy a Cyc fehérjék hiánya nemcsak nitrogénkötésben (Fix^-) és nitrát redukcióban (Rnr^-) 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 enzimmal, és elősegítheti annak működését.

A CycH fehérje C-terminális periplazmatikus szakaszát vizsgálva három tetratrikopeptid (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 Fix^+ , sem a 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 szimbiótikus 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.

Közlemények 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 A, 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 15:922-931

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Szeged, 2004. április 10

Dr. Dusha Ilona

Egyéb közlemények

Poszterek

1. Bodogai M, **Cinege G**, Dusha I (2003) The regulatory cascade of *nif-fix* genes is under the control of *ntrR* in *Sinorhizobium meliloti*. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok.
2. **Cinege G**, Kereszt A, Balogh G, Dusha I (2002) Regulation of *cycHJKL* operon and its role in *c*-type cytochrome biogenesis. 5th European Nitrogen Fixation Conference, Norwich, United Kingdom.
3. **Cinege G**, Kereszt A, Balogh G, Dusha I (2002) Egy citokróm *c* hem liáz doménjeinek szerepe a *c*-típusú citokrómok biogenezisében. A Magyar Biokémiai Egyesület Munkaértekezlete, Keszthely.
4. **Cinege G**, Kereszt A, Dusha I (1999) *c*-típusú citokrómok biogenezisében résztvevő gének szerepe és regulációja. A Magyar Biokémiai Egyesület Munkaértekezlete, Sopron.

Előadások

1. **Cinege G**, Kereszt A, Balogh G, Dusha I (2003) A CycH fehérje doménjeinek szerepe a *c*-típusú citokrómok biogenezisében. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok.
2. **Cinege G**, Kereszt A, Borzi J, Balogh G, Dusha I (2002) Egy citokróm *c* hem liáz doménjeinek szerepe a *c*-típusú citokrómok biogenezisében. Straub-Napok, MTA Szegedi Biológiai Központ.
3. **Cinege G**, Kereszt A, Borzi J, Dusha I (2000) *c*-típusú citokrómok biogenezisében résztvevő gének szerepe és regulációja

Sinorhizobium meliloti-ban. Straub-Napok, MTA Szegedi Biológiai Központ.

4. Cinege G, Dusha I (1999) Oxygen dependent regulation of *cyc* genes in *Sinorhizobium meliloti*. Closing Symposium of the International Training Course organised by the UNESCO, ICRO and the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged.