B 3528

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

PhD értekezés

Készítette:

Kiss Ernő

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Témavezető:

Dr. Kondorosi Ádám

Szeged, 1998

TARTALOM oldal

ELŐSZÓ 4.
1. BEVEZETÉS 5.
1.1. A szimbiótikus nitrogénkötés 6.
1.2. A nitrogénkötő gümő kialakulása 6.
1.3. A baktériumok sejtfelszíni molekulái 13.
1.3.1. A Gram negatív baktériumok sejtfelszíne 13.
1.3.2. A *Rhizobiumok* sejtfelszíni poliszacharidjai 14.
1.3.2.1. A ciklikus β-glükánok 14.
1.3.2.2. Az exopoliszacharidok 16.
1.3.2.3. A lipopoliszacharidok 20.
1.3.2.4. A kapszuláris poliszacharidok 21.
1.4. A *Rhizobiumok* és a növényi védekezési reakciók 24.
1.5. Kutatási előzmények: A *R. meliloti fix-23* régiójának izolálása és kezdeti analízise 26.
2. CÉLKITŰZÉSEK 29.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 30.
3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok 30.
3.2. Mikrobiológiai eljárások 31.
3.3. Rekombináns DNS-technikák 33.
3.4. A DNS bázissorendjének meghatározása 33.
3.5. A β-galaktozidáz enzim aktivitásának mérése 34.
3.6. Növényi teszt 34.
3.7. Kapszuláris poliszacharidok izolálása 34.
3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) 35.
3.9. Immunoblot analízis 35.
3.10. Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR) 35.
3.11. Enzimkötött immun-adszorpciós (ELIZA) vizsgálat 36.
4. EREDMÉNYEK 37.
4.1. A *fix-23* régió II., III., és IV. komplementációs egységének szubklónozása és szekvencia analízise 37.
4.1.1. Az *rkpG* analízise 47.
4.1.2. Az *rkpH* analízise 49.
4.1.3. Az *rkpI* analízise 51.
4.1.4. Az *rkpJ* analízise 51.
4.2. A *fix-23* mutánsok által termelt KPS vizsgálata 53.
4.2.1. A poliszacharidok PAGE analízise 53.

4.2.2. A poliszacharidok immunkémiai analízise 55.
4.2.3. A poliszacharidok ELIZA analízise 58.
4.2.4. NMR analízis 59.
4.3. A *R. meliloti* kapszuláris poliszacharid szintézisében résztvevő további géncsoportok azonosítása és analízise 60.
4.3.1. Az *rkp-2* régió analízise 62.
4.3.1.1. Az *rkp-2* régió szekvencia analízise 63.
4.3.2. Az *rkp-3* régió kezdeti analízise 66.
5. MEGVITATÁS 73.
5.1. Az *rkp* mutánsok pleiotróp fenotípusa 73.
5.2. Az *rkp* gének feltételezett szerepe, a rhizobiális KPS szintézisének modellje 75.
6. ÖSSZEFOGLALÁS 82.
7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ 83.
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 89.
9. IRODALOMJEGYZÉK 91.

ELŐSZÓ

A dolgozatban ismertetett kísérleti munka az MTA Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében, a Nitrogénkötési Csoportban készült.

Köszönettel tartozom a Genetikai Intézet jelenlegi és volt igazgatóinak, Dr. Raskó Istvánnak és Dr. Alföldi Lajosnak, hogy munkám lehetővé tették az általuk vezetett intézetben.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kondorosi Ádámnak, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, nagyon sok szakmai segítséget nyújtva az értekezésben tárgyalt munka elvégzéséhez. Külön köszönöm a dolgozat megírásával kapcsolatos hasznos tanácsait és bírálatait.

Az értekezés anyaga csoportmunkán alapul. Köszönet a Nitrogénkötési Csoport valamennyi tagjának, akik az évek során elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítették munkámat, közülük is külön köszönettel tartozom Dr. Petrovics Györgynek, Dr. Kereszt Attilának és Dr. Putnoky Péternek, hogy munkájukkal megalapozták, és kiegészítették az általam végzett kísérleteket.

Köszönettel tartozom a Russel W. Carlson vezette amerikai kooperációs csoportunknak (Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA) a poliszacharidok kémiai analizisében nyújtott pótolhatatlan munkájáért.

Köszönöm Dr. Györgypál Zoltánnak a számítógépes szekvencia analízis módszereinek elsajátításában nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dr. Dusha Ilonát és Dr. Kereszt Attilát a dolgozat kritikus szemmel való elolvasásáért és hasznos tanácsaikért.

Köszönetemet fejezem ki Liptay Zsuzsa és Jenei Sándor asszisztenseknek lelkiismeretes munkájukért.

Köszönöm Tóth Sándornénak a dolgozat ábráinak elkészítésében nyújtott segítségét, valamint köszönöm Dr. Putnoky Péternek, hogy az általa készített 3., 19., és 20. ábrát a rendelkezésemre bocsátotta.

Külön köszönöm Dr. Kondorosi Ádámnak és Dr. Kondorosi Évának a lehetőséget, hogy a gifi (Franciaország) Institut des Sciences Végétales-ben (CNRS) működő csoportjaikban dolgozva bekapcsolódhassak az ott folyó számos témába, és belekóstolhassak a szimbiótikus nitrogenkötés kutatásának növényi részébe is.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és feleségemnek akik mindig bíztak bennem és nyugodt, szeretetteljes hátteret biztosítottak ahhoz, hogy biológus válhasson belőlem.

BEVEZETÉS

Az élő szervezeteket felépítő egyik leggyakoribb elem a nitrogén. A föld nitrogén készletének jelentős része gáz halmazállapotú, amelyet az élőlények túlnyomó többsége nem képes közvetlenül hasznosítani. Az úgynevezett diazotróf mikroorganizmusoktól eltekintve ugyanis az élő szervezetek csak a kötött nitrogént tudják beépíteni saját anyagaikba. A nitrogénkötésre képes prokarióta fajok száma több százra tehető. Megtalálhatóak köztük fotoszintetizáló (pl. *Rhodospirillum rubrum*), anaerob (pl. *Clostridium* spp.), mikroaerob (pl. *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azorhizobium*), aerob (pl. *Azotobacter*) és szimbionta (pl. *Rhizobium*) baktériumok, valamint aktinomicéta gombák (pl. *Frankia*). Ezek a mikroorganizmusok a molekuláris nitrogént ammóniává redukálják, növelve a talaj hasznosítható nitrogéntartalmát. Az ammónia már képes beépülni a növények aminosavaiba, onnan pedig más nitrogén tartalmú vegyületeibe. A lebontó, denitrifikáló folyamatok eredményeképpen a szerves vegyületekből felszabaduló nitrogén visszakerül a légkörbe. Az ökoszisztéma nitrogén körforgalmának egyensúlyához tehát folyamatos $N_2 \longrightarrow NH_3$ átalakulás, azaz nitrogénkötés szükséges.

A termőterületek intenzív mezőgazdasági tevékenység miatti nitrogénveszteségét napjainkban műtrágyázással pótolják. Ez azonban csak rövid távon nyújthat megoldást, hiszen ez a módszer igen költséges (egy tonna műtrágya előállításához 1,3 t kőolaj származék elégetéséből származó energia szükséges), és nagymértékben károsítja a környezetet. A talajból az élővizekbe mosódó nitrogén-sók tönkreteszik azok élővilágát, szennyezik az ivóvíz készleteket, és a tavak eutrofizációjához vezetnek. A műtrágya gyártás során a légkörbe kerülő nitrogén-oxidok fokozzák az üvegházhatást, ami bolygónk globális felmelegedéséhez járul hozzá. Mindez beláthatatlan veszteséget és veszélyt jelent az emberiség számára. 1990-ben a világ nitrogén műtrágya felhasználása 80 millió tonna volt (Brown, 1994). Becslések szerint 2020-ra 160 millió t termelése válik szükségessé (Dyson, 1996), mivel a Föld lakóinak száma elérheti a 9 milliárdot. Az emberiség

élelmiszer ellátása óriási terhet fog jelenteni a mezőgazdaságnak. Előtérbe kerülnek tehát azok a kutatási területek, amelyek eredményei felhasználhatók az élelemtermelés fokozására. A biológiai úton megkötött nitrogén mennyiségének növelése tehát a probléma elméleti érdekességén túl, égető gyakorlati szükségszerűség is. Így érthető, hogy a biológiai kutatások egy része a nitrogénkötés megismerésére, ezen belül a szimbiótikus nitrogénkötés fokozásának és kiterjesztésének lehetőségeire irányul.

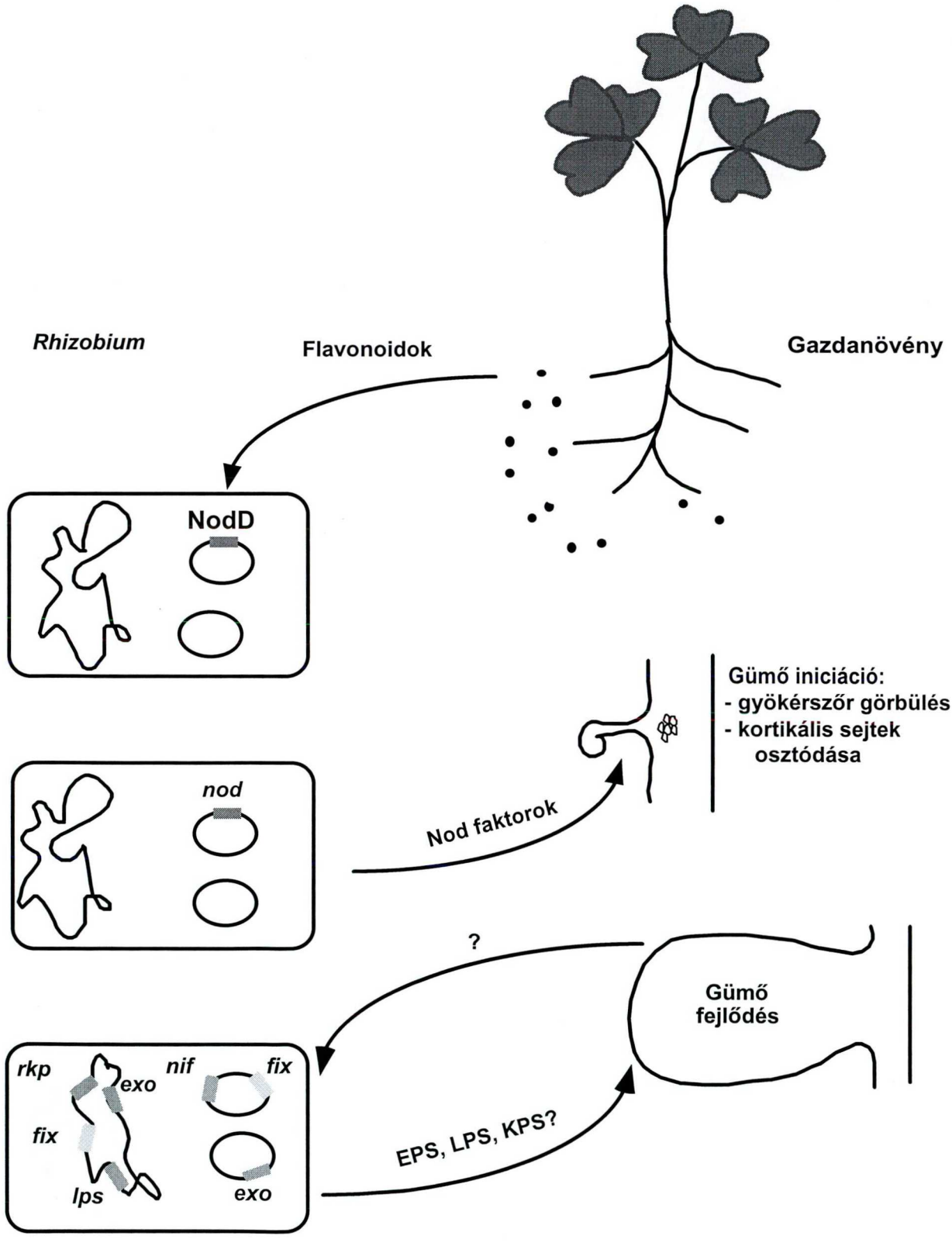
1.1. A szimbiótikus nitrogénkötés

A diazotróf mikroorganizmusok egy része szabadon élve (pl. *Klebsiella*, *Azospirillum*), míg más részük a *Parasponia* fajok kivételével mindig pillangósvirágú növényi partnerrel szimbiózisban (pl. *Rhizobium*) képes a levegő nitrogénjének megkötésére (Allen és Allen, 1981). A nitrogénkötés szimbiótikus formája a leghatékonyabb, hiszen itt a folyamat magas energia igényének nagy részét a növény fedezi. Az egymással szimbiózisra lépő fajok köre szigorúan meghatározott. Egy adott baktérium faj csak bizonyos gazda növényekkel képes együttműködést kialakítani, azaz a folyamat gazdaspecifikus. Az ún. szűk gazdaspecifitású fajok (pl. *R. meliloti*) csak igen korlátozott számú növényfajjal (*Medicago, Melilotus, Trigonella*) képes effektív szimbiózist kialakítani. Egyes széles gazdaspecifitású fajokra igen nagy "promiszkuitás" jellemző, a *R.* sp. NGR234 például több mint 110 növénnyel létesít szimbiótikus kapcsolatot. A folyamat specifitását a partnerek közötti, egyedi szignálmolekulák cseréjén alapuló kommunikáció biztosítja (1. ábra). A szimbiótikus nitrogénkötés színtere a növény gyökerén kialakuló speciális szerv, a gyökérgümő.

1.2. A nitrogénkötő gümő kialakulása

A szimbiózis kialakulásának első szakaszában, a pre-infekció során a partnerek kölcsönös felismerése zajlik. A gazdanövények gyökeréből kibocsátott különböző típusú vegyületek (cukrok, aminosavak, flavonoidok) a szabadon élő *Rhizobiumok* pozitív

kemotaxisát váltják ki (Bergman és mtsai, 1988). Habár sem a mozgásképesség, sem a kemotaxis nem elengedhetetlen feltétele a gümő kialakulásának, ezek a tulajdonságok szelektív előnyt biztosítanak a vad típusú baktériumoknak a mozgás és jelmolekula felismerésre képtelen mutánsokkal szemben (Caetano-Anollés és mtsai, 1988).



1. ábra. A *R. meliloti* és a lucerna között folyó jelcsere sémája. A sematikus *Rhizobiumokban* látható alakzatok a baktérium kromoszómáját és két nagyobb plazmidját jelölik. EPS, LPS, KPS: sejtfelszíni poliszacharid típusok. *exo, lps, rkp, nif, fix*: a szimbiózis során szerepet játszó géncsoportok.

A gyökér közvetlen közelébe kerülő *Rhizobiumok* a fiatal gyökérszőrökhöz tapadnak (Dazzo és mtsai, 1984). A kezdeti elképzelések szerint a felismerési folyamat specifitását a gazdanövény gyökere, és a megfelelő baktérium sejtfelszíne közötti kötődés határozza meg. A feltételezés alapjául növényi lektin molekulák bakteriális sejtfelszíni poliszacharidokhoz való kötődése szolgált (Dazzo és mtsai, 1983). A későbbiekben a gazdaspecifikus kötődésnek ellentmondó kísérleti eredmények láttak napvilágot, amelyek *Rhizobiumok* egyenlő mértékű tapadását írták le a gazda- és heterológ növények gyökeréhez (Smit, 1986). A jelenlegi elképzelések szerint a baktériumok kötődése a gyökérszőrök felületén két lépésben történik. Először egy laza, nem gazdaspecifikus kapcsolat jön létre, melynek kialakításában egy bakteriális Ca^{2+}-kötő fehérjének, a rhicadhézinnek egy ezeddig még nem azonosított növényi receptorhoz való kötődése játsza a fő szerepet (Smit, 1987). A második lépésben további baktérium sejtek aggregálódnak az előzőleg már a gyökérhez tapadtakhoz, miközben a partnerek közötti kapcsolat is szorosabbá válik bakteriális cellulóz fibrillumok, és növényi lektinek kapcsolódása révén (Smit, 1987).

A megtapadt baktériumok a növekedésben levő gyökérszőrök görbülését, elágazódását váltják ki. Ezzel egyidőben a gyökér kéregsejtjei osztódni kezdenek, aminek eredményeképpen kialakul a fejlődő gümő szöveteit létrehozó gümőmerisztéma (Dudley és mtsai, 1987). A gazda-szimbionta kapcsolat e kezdeti lépéseit meghatározó kommunikáció során kitüntetett szerepe van a növény gyökere által kibocsátott különböző típusú flavonoidoknak (Rolfe, 1988). Ezek a vegyületek nemcsak a szimbionták kemotaxisában, hanem gümőképzési vagy más néven nodulációs (*nod*) génjeinek aktiválásában is szerepet játszanak. Minden növény egy jellemző összetételű flavonoid keveréket bocsát ki a gyökeréből, melynek spektruma az adott növényfajtól, annak fejlődési stádiumától, valamint egyéb környezeti tényezőktől, pl. a talaj nitrogén ellátottságától függ. E flavonoid keverék egyes komponensei serkentőleg, míg mások gátlólag hatnak a *Rhizobiumok* nodulációs génjeire (Györgypál és mtsai, 1988, 1991a,b). A flavonoidok bizonyos

csoportja az izoflavonoidok más mikroorganizmusokra nézve toxikusak (fitoalexinek), kibocsátásuk a növények patogének elleni védekezési reakciójának része (Koes és mtsai, 1993; Phillips és Kapulnik, 1995). A *Rhizobiumok* azonban az evolúció során feltehetőleg alkalmazkodni tudtak a flavonoidok toxikus hatásához (Parniske és mtsai, 1991).

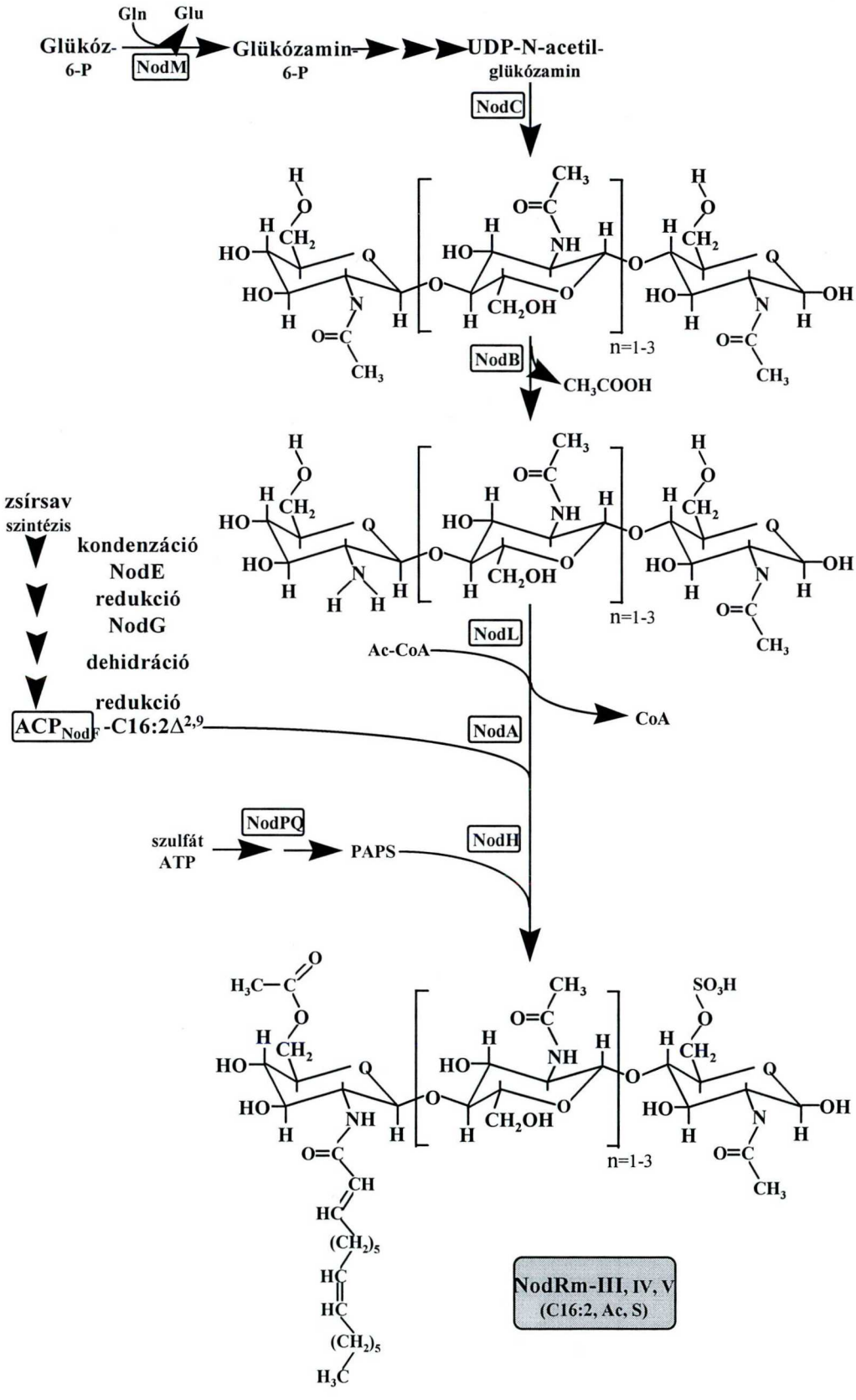
A flavonoid molekulákat, mint elsődleges növényi szignálokat a baktériumokban egy vagy több kópiában megtalálható *nodD* gén(ek) terméke érzékeli. A különböző NodD fehérjék flavonoid felismerése eltérő (Horváth és mtsai, 1987; Györgypál és mtsai, 1991), azaz szigorúan meghatározott, hogy mely növények mely *Rhizobiumok* gümőképzési génjeit képesek aktiválni. A NodD fehérjék a flavonoidokkal kölcsönhatva kötődnek az operonokba szerveződött *nod* gének promóter régiójában található, erősen konzerválódott cisz-regulátor DNS szakaszokhoz, az ún. *nod*-boxokhoz (Rostás és mtsai, 1986). Ennek következtében a szabadon élő baktériumokban nem, vagy csak igen alacsony szinten expresszálódó *nod* operonok kifejeződnek (Kondorosi és Kondorosi, 1986). A *nod* gének által kódolt fehérjék lipokito-oligoszacharid molekulák, az ún. Nod-faktorok szintéziséért felelősek (2. ábra), amelyek válasz jelül szolgálnak a gazdanövény számára (Lerouge és mtsai, 1990). Az erős szekvencia konzerválódást mutató közös *nod* gének (*nodABCIJ*) minden *Rhizobiumban* megtalálhatóak, feladatuk a Nod-faktorok alapvázának szintézisében, és a kész molekula transzportjában résztvevő enzimek kódolása. Ezzel szemben az ún. gazdaspecifitási *nod* gének (*nodFELGHPQSXZ*) nem minden fajban találhatóak meg. Az általuk meghatározott fehérjék a Nod-faktor oligoszacharid láncának az adott fajra jellemző módosításait végzik. Minden egyes *Rhizobium* többféle, kissé eltérő szerkezetű Nod-faktort termel, melyek az adott gazdanövényen különböző mértékben serkentő hatásúak, amely tulajdonságot a jelmolekula alapvázához kapcsolódó szubsztituensek határoznak meg (Schultze és mtsai, 1994; Dénarié és mtsai, 1996). A Nod-faktorok gazdaspecifikus aktivitásának szempontjából meghatározó jelentőségű a kito-oligoszacharid alaplánc hossza, a nem redukáló vég O-acetiláltsága, a redukáló vég O-

acetiláltsága, vagy szulfatáltsága, valamint az alapvázhoz kapcsolódó zsírsavlánc hossza és telítetlenségének foka (Schultze és Kondorosi, 1996).

A Nod-faktorok a baktériumok hiányában is képesek kiváltani a gyökérsejtek plazmamembránjának depolarizációját (Ehrhardt és mtsai, 1992; Felle és mtsai, 1995), az intracelluláris Ca^{2+}-szint oszcillációját (Ehrhardt és mtsai, 1996), az aktin filamentumok átrendeződését (Allen és mtsai, 1994), valamint a gyökérszőrök görbülését, és a gyökér kéregsejtjeinek osztódását (Lerouge és mtsai, 1990; Truchet és mtsai, 1991). Feltételezések szerint a Nod-faktor molekulák a gyökérszőrök felületén található, eddig még nem azonosított receptorokhoz kötődnek (Ardourel és mtsai, 1994). Habár a Nod-faktorokat a *Rhizobiumok* kibocsátják a környezetükbe, egyes elképzelések szerint hatásukat, legalábbis részben, mégis lipid oldalláncukkal a baktérium külső membránjához kihorgonyozva fejtik ki (Hirsch, 1992) Feltételezik, hogy a megtapadás során az addig a gyökérszőr felületén egyenletesen eloszlott receptorok a fiatal epidermisz sejtek membránjában oldalirányban elmozdulva a megtapadt *Rhizobium* körül feldúsulnak, ami a sejtek egyenlőtlen megnyúlásához, következésképpen a gyökérszőr meggörbüléséhez vezet (Hirsch,1992). A pásztorbotszerűen megtekeredett gyökérszőrök által csapdába ejtett *Rhizobiumok* egy bizonyos ponton hidrolizálják a gyökérsejtek falát (Callaham és Torrey, 1981), és növényi sejtfal anyagokból álló, ún. infekciós fonalakon keresztül behatolnak a gyökérbe. Egyes feltételezések szerint az infekciós fonalakba prolinban gazdag ún. korai nodulinok, mint pl. az ENOD5 és ENOD12 (Scheres és mtsai, 1990 a,b) épülhetnek be. A növekvő infekciós fonál mikrotubulusok és citoplazma hidak sugaras átrendeződésével képződő preinfekciós fonalak által irányítva halad keresztül a kéreg sejteken a fejlődő gümő primordium irányába (Kijne, 1992).

A jelenlegi elképzelések szerint a Nod-faktorok egy eddig még ismeretlen szignáltranszdukciós kaszkádon keresztül egyes növényi hormonok (auxin, citokinin) egyensúlyának megváltozásához vezetnek, ami a protoxilem-pólusokból származó ún.

sztéle-faktor (uridin) koncentráció gradiensével együtt indukálja a gümő merisztémát létrehozó kortikális sejtek osztódását (Geurts és Franssen, 1996).



2. ábra A Nod faktorok szintézise *R. melilotiban*.

A morfológiai és fiziológiai változások mellett a Nod-faktorok hatására számos növényi gén indukciója is detektálható, mint például a korai nodulin gének közé tartozó *enod12* (Bauer és mtsai, 1994) és *enod40* (Crespi és mtsai, 1994), valamint az osztódásnak indult kéregsejtekben reaktiválódnak a sejtciklus gének (Yang és mtsai, 1994). A fent említett folyamatok eredményeként kialakul a gümő szerkezete.

A gümőmerisztéma működése alapján kétféle gümő típust különböztetünk meg (Newcomb és mtsai, 1981). A determinált gümőkben (szója) a merisztéma a külső kortikális sejtekből jön létre, működése hamar leáll, minek következtében a gümő belső sejtjei közel azonos korúak és fejlődési stádiumúak. Az indeterminált gümő a belső kortex sejtek osztódásával képződik, működése folyamatos, következésképpen a merisztémától távolodva a sejtek különböző fejlődési stádiumú zónákat alkotnak (Vasse és mtsai, 1990). A folyamatosan osztódó merisztémához legközelebbi, fiatal sejtekből álló prefixációs zónában történik meg a gümőinvázió. A többszörösen elágazó infekciós fonalban a baktériumok folyamatosan osztódnak, és a növényi sejtek citoplazmájával történő közvetlen érintkezés nélkül jutnak el a gümő belsejébe (Turgeon és Bauer, 1982). Ott az endocitózishoz hasonló folyamat során a növényi eredetű, ún. peribakteroid membránba "csomagolva" kerülnek be a gümősejtek citoplazmájába (Verma, 1992). További osztódásuk leáll, és számos egyéb változás következtében a *Rhizobium*ok endoszimbiótikus formájává, bakteroidokká alakulnak.

Az interzónában kezdődnek el, majd a nitrogénkötési zónában teljesednek ki a légköri nitrogén megkötéséhez vezető folyamatok. Az érett gümősejtekben a bakteroidok megkezdik a levegő nitrogénjének redukálását a nitrogenáz enzimkomplex segítségével, amely egy homodimer Fe-proteinből és egy heterotetramer MoFe kofaktorból álló polimer (Dean és mtsai, 1993). A nitrogenáz működéséhez szükséges alacsony oxigéntenziót egy hem-tartalmú oxigénkötő fehérje, a leghemoglobin biztosítja (Powel és Gannon, 1988). A megkötött nitrogén ammónia formájában transzportálódik a növénybe, ahol elsősorban glutaminba beépülve bekapcsolódik a nitrogén anyagcserébe (Schubert, 1986).

Végül a merisztémától legtávolabb eső öregedési zónában a bakteroidok elveszítik funkcióképességüket és elpusztulnak.

1.3. A baktériumok sejtfelszíni molekulái

A sejtfelszíni molekulák meghatározó szerepet játszanak mind a parazita, mind a szimbionta mikroorganizmusok gazdasejtekkel való kölcsönhatásakor. Ezek az anyagok kerülnek először közvetlen kapcsolatba a sejtek egymással való érintkezése során, ezért joggal feltételezhetjük, hogy a sejtek felületén található molekulák döntő módon befolyásolják a felismerési és kommunikációs folyamatokat.

1.3.1. A Gram-negatív baktériumok sejtfelszíne

A Gram-negatív baktériumok sejtburkát egy külső és egy belső membrán, valamint a köztük levő peptidoglükán réteg alkotja (Whitfield és Valvano, 1993). A sejtek citoplazmáját közvetlenül határoló belső membrán egy szimmetrikus foszfolipid kettősréteg, amelybe hidrofób felükkel membránproteinek ágyazódnak, melyek számos funkciót látnak el, pl.: elektrontranszport, oxidatív foszforiláció, specifikus ion és tápanyag transzport, szignáltranszdukció, valamint makromolekulák, mint pl. poliszacharidok szintézise (Lugtenberg és vanAlpen, 1983). A plazmamembránt kívülről borító peptidoglükán réteg a sejt merev, ozmotikus nyomásnak ellenálló vázát alkotja. Habár a külső és belső membrán közötti részt periplazmatikus térnek nevezik, ezt gyakran elektronsűrű, gélszerű anyag tölti ki (Graham és mtsai, 1991). Az itt található fehérjék különböző makromolekulák felvételében és leadásában játszanak szerepet. A külső membrán aszimmetrikus felépítésű, belső felszíne foszfolipidekből, külső rétege főképpen lipopoliszacharidokból (LPS) és kapszuláris poliszacharidokból (KPS) áll (Nikaido és Vaara, 1985). A Gram-negatív baktériumok termelnek még exopoliszacharidokat (EPS) is, amelyek az előzőekkel ellentétben nem kapcsolódnak szorosan a külső membránhoz, hanem kiválasztódnak a környezetbe.

A fentiekből kitűnik, hogy a sejtek felszínét túlnyomó többségben poliszacharid jellegű anyagok borítják. Helyzetükből adódóan ezek a molekulák határozzák meg elsősorban a baktériumok és környezetük kapcsolatát. Jelentős szerepük van a folyamatosan változó környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodásban, hiszen védelmet jelentenek többek között a kiszáradás és az ozmotikus nyomásváltozás ellen, valamint a fehérjékénél jóval gyengébb antigén tulajdonságuknál fogva maszkírozó szerepet töltenek be a gazdaszervezet védekezési mechanizmusaival szemben (Jann és Jann, 1992). Egyre több kísérleti adat támasztja alá azt a feltételezést, hogy a sejtfelszíni poliszacharidok kulcsszerepet játszanak a szimbiótikus gümő inváziója során (Kannenberg és Brewin, 1994).

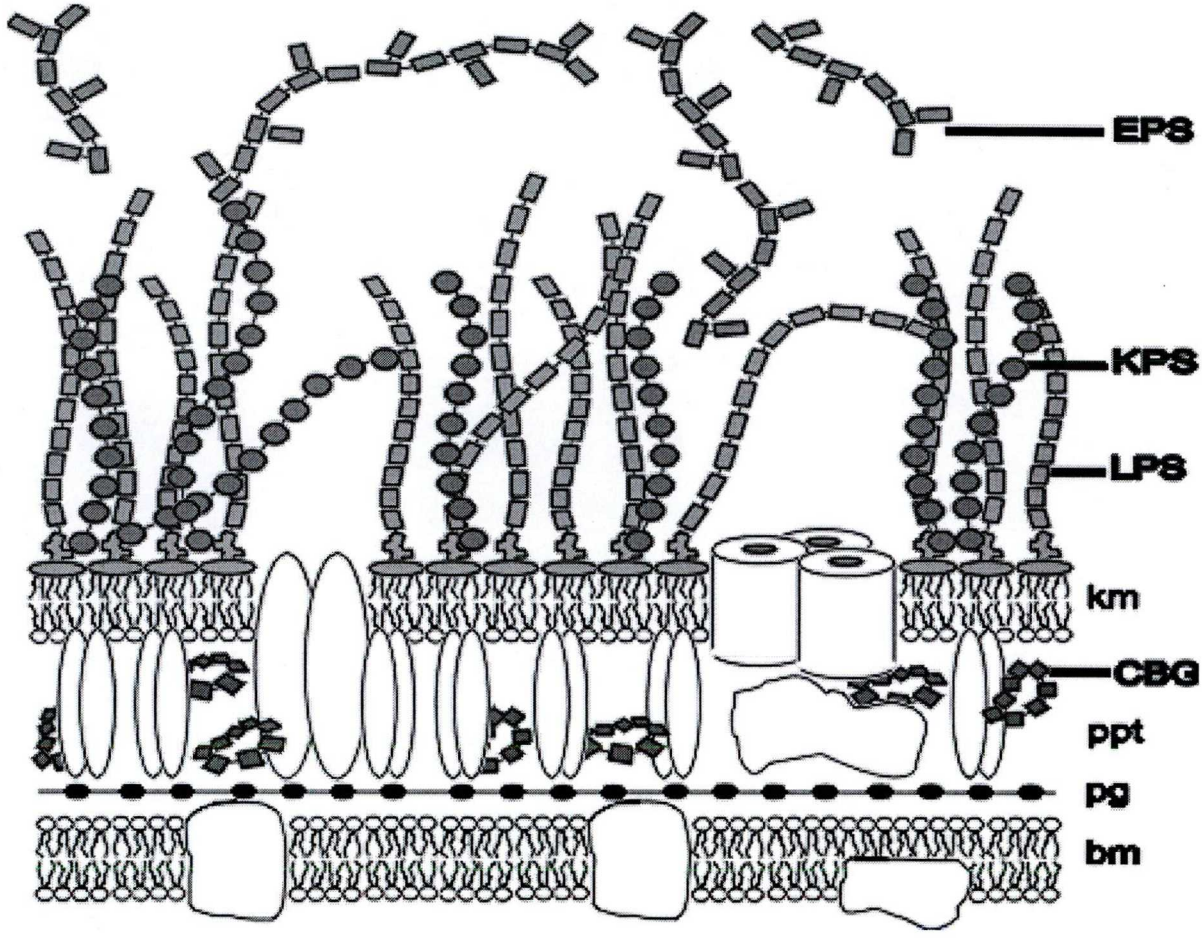
1.3.2. A *Rhizobiumok* sejtfelszíni poliszacharidjai

A *Rhizobium* sejtek legfőbb poliszacharid típusai a ciklikus β-glükánok, a savas exopoliszacharidok (EPS), a lipopoliszacharidok (LPS), valamint a kapszuláris poliszacharidok (KPS).

1.3.2.1. A ciklikus β-glükánok

A ciklikus β-glükánok szinte kizárólag a *Rhizobiaceae* családra jellemző polimer vegyületek. A glükóz monomerek *Agrobacterium* és *Rhizobium* fajokban β-(1-2), míg *Bradyrhizobium* fajokban β-(1-3) és β-(1-6) glükozidos kötésekkel 17-40 tagszámú gyűrűvé kapcsolódnak össze. Az alapgyűrűhöz foszfoglicerol, borostyánkősav, és metilmalonilsav szubsztituensek kapcsolódnak (Breedveld és Miller, 1994). A molekulák egy részét a sejt a környezetébe bocsátja, de túlnyomó többségük a periplazmatikus térben marad. A β-glükánok szintéziséért *Agrobacteriumokban* a *chvAB* (Douglas és mtsai, 1985), *R. melilotiban* a velük szerkezetileg és funkcionálisan homológ *ndvAB* gének(Dylan és mtsai, 1986) felelősek. A ChvB/NdvB fehérjék a poliszacharidok szintézisében, míg a ChvA/NdvA fehérjék a transzportjában vesznek részt. A *chv* gének mutációja esetén az *Agrobacteriumok* elveszítik fertőzőképességüket, míg az *ndv* gének hibája korán elhaló

infekciós fonalakat (Inf$^-$), baktériumokat nem tartalmazó, nitrogénkötésre képtelen (Fix$^-$) gümőket eredményez.



3. ábra. A *R. meliloti* sejtfelszínének poliszacharid komponensei. km=külső membrán, bm=belső membrán, CBG=ciklikus β-glükán, pg=peptidoglükán, ppt=periplazmatikus tér

A ciklikus β-glükánok szintézise nagy mértékben fokozódik a környezet alacsony ozmolaritása esetén (Breedveld és mtsai, 1990). Ebből a hipoozmotikus körülményekhez való alkalmazkodásban betöltött szerepükre lehet következtetni (Dylan és mtsai, 1990a). Ezek a vegyületek nem feltétlenül szükségesek az effektív szimbiózis kialakításához, ugyanis olyan *ndv* pszeudorevertánsokat sikerült izolálni, amelyek részben visszanyerték ozmotoleranciájukat és Fix$^+$ fenotípusukat, de továbbra sem termeltek β-glükánokat (Dylan és mtsai, 1990b). Az *ndv* mutációkat nem sikerült külsőleg adagolt β-glükánokkal

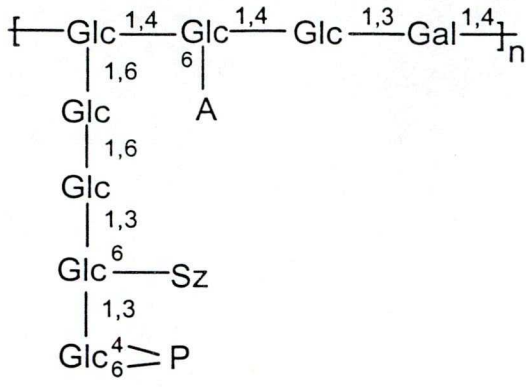
komplementálni, azonban érdekes módon vad típusú baktériumokkal együtt adva már mikromolos mennyiségben gyorsabb gümőfejlődést és gümőszám emelkedést kaptak (Dylan és mtsai, 1990b), ami felveti annak a lehetőségét, hogy a környezetbe exportált β-glükán az infekció vagy invázió során bakteriális jelmolekulaként szerepelhet. Az *ndv* mutációk okozta pleiotróp fenotípust könnyen megmagyarázhatjuk úgy, ha feltételezzük, hogy a periplazmatikus és az extracelluláris β-glükánok különböző, de egyaránt fontos szerepet játszanak a sikeres szimbiózis kialakulása során. Az extracelluláris β-glükánok a gyökérszőrökhöz való tapadásban, vagy mint a gümőfejlődést serkentő bakteriális szignál, míg a periplazmatikusak az infekciós fonál, illetve a gümősejtek eltérő ozmotikus viszonyaihoz való alkalmazkodásban tölthetnek be szerepet (Breedveld és Miller, 1994).

1.3.2.2. Az exopoliszacharidok

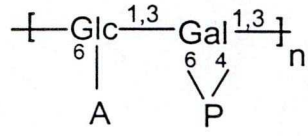
A *Rhizobiumok* savas EPS-e nagy molekulasúlyú heteropoliszacharid, melyet 7-9 cukortagból álló, ismétlődő egységek (oligoszacharidok) építenek fel. Ezek az ismétlődő oligoszacharid egységek különböző α és β kötésű, egyenes vagy elágazó láncú cukormolekulákból állnak, gyakran nem szénhidrát szubsztituenseket is tartalmaznak (pl. szukcinil, piruvil, acetil). A poliszacharidok savas természetét az uronsavak és az említett szubsztituensek okozzák.

A *R. meliloti* fő exopoliszacharidja a szukcinoglükán (EPS I) oktaszacharid egységekből felépülő heteropolimer (4. ábra). Az alapváz 7 glükóz és egy galaktóz molekulából, valamint 1-1 piruvil, acetil és szukcinil csoportból épül fel (Aman és mtsai, 1981). A termelődő EPS-t a baktérium mindkét membránján keresztül exportálja. A molekulák egy része lazán a sejtek felszínére tapad, a baktériumok mukoid fenotípusát okozva, nagyobb részük azonban a környező közegbe jut. Az EPS I hiányában a gyökérszőrök görbülése késik, az infekciós fonalak korai stádiumban elhalnak, bakteroidokat nem tartalmazó, Fix$^-$ gümők jönnek létre, azaz a gümőfejlődés a baktérium invázió szakaszában áll le (Finan és mtsai, 1985; Leigh és mtsai, 1985, 1987).

Szukcinoglükán
(EPS I)

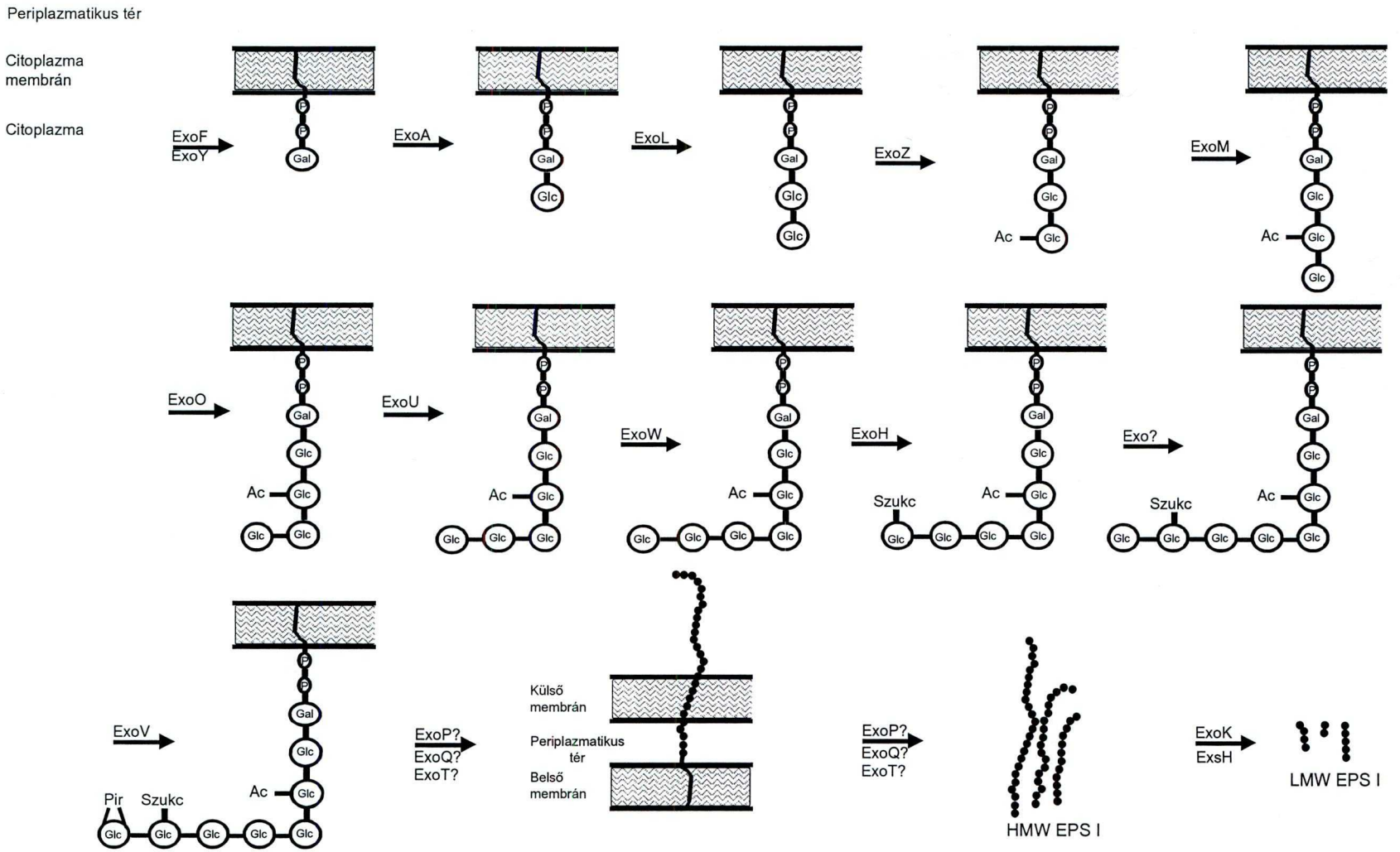


EPS II



4. ábra. A *R. meliloti* exopoliszacharidjai. Glc=glükóz, Gal=galaktóz, A=acetil csoport, Sz=szukcinil csoport, P=piruvil csoport, 1,3=β-(1-3) glükozidos kötés, 1,6=β-(1-6) glükozidos kötés, az ábrán látható további számok a cukormolekulának azt a szénatomját jelölik, amelyhez a szubsztituens kapcsolódik.

Az EPS I szintéziséért *R. melilotiban* az ún. *exo* gének felelősek (5. ábra). Az oktaszacharid alegységek szintézise során az aktivált cukoregységek (UDP-glükóz, UDP-galaktóz) meghatározott sorrendben kapcsolódnak össze egy belső membránhoz kötött lipid hordozón (Southerland, 1985). Az oligomerekre szintézisük közben épülnek rá az oldalláncok, majd az acetil, piruvil és szukcinil módosításokkal ellátott oktaszacharid alegységek egymáshoz kapcsolódásával jön létre a kész polimer (Glucksmann és mtsai, 1993). Oszlopkromatográfiás módszerekkel az EPS I-et egy nagy molekulatömegű (HMW), és egy 1-4 oktaszacharid egységből álló kis molekulatömegű (LMW) frakcióra lehet bontani. A különböző frakciókat külön-külön vizsgálva megállapították, hogy az LMW EPS komplementálni képes az *exoA, exoB, exoF és exoH* gének mutációja következtében kialakuló Inf$^-$ és Fix$^-$ fenotípust, azaz a szimbiótikus aktivitásért a kis molekulatömegű EPS lehet a felelős (Battisti és mtsai, 1992). Feltételezések szerint a biológiailag aktív LMW EPS, legalábbis részben, a HMW EPS egy, vagy több bakteriális endoglükanáz általi hidrolízisével keletkezik. Erre utal, hogy az *exoK* és az *exsH* gén terméke β-1,3-1,4 endoglükanázokkal mutat homológiát (Becker és mtsai, 1993b; Glucksmann és mtsai, 1993; York és Walker, 1997). Emellett az LMW EPS *de novo* is képződik, oly módon, hogy a polimerizáció egy ponton megáll.



5. ábra. Az EPS I szintézisének modellje *R. melilotiban*. p=foszfát csoport; Gal=galaktóz; Glc=glükóz; Ac=acetil csoport; Szukc=szukcinil csoport; Pir=piruvil csoport A fekete pontok oktamer egységeket jelölnek. HMW=nagymolsúlyú; LMW=kismolsúlyú. (Glucksmann és mtsai, 1993)

Ilyen lánchossz determináló szerepet tulajdonítanak az *exoP*, *exoQ*, *exoT* gének valamelyikének (González és mtsai, 1996a).

R. melilotiban kimutattak egy másik savas EPS típust (EPS II), ami csak a *mucR* (Keller és mtsai, 1995) és az *expR101* (Glazebrook és Walker 1989) gének mutációja esetén termelődik. Az EPS II glükózból és galaktózból álló diszacharid egységekből épül fel, amihez acetil és piruvil csoport kapcsolódik (4. ábra). Szintéziséhez az *exoB* és *exoC* gének mellett legalább hét olyan *exp* gén kell, amelyek az EPS I szintézisében nem vesznek részt (Glazebrook és Walker, 1989). Az *expR101* mutáns baktérium által termelt EPS II komplementálni képes az EPS I hiányában fellépő szimbiótikus fenotípust, míg a *mucR*$^-$ által termelt nem. A mutánsok által termelt poliszacharidok analíziséből kiderült, hogy mindkét mutáns szerkezetileg azonos HMW EPS II-t állít elő, de LMW EPS II termelésére csak az *expR101* mutáns baktérium képes. Tisztított poliszacharidokkal végzett komplementációs kísérletekkel sikerült bizonyítani, hogy a szimbiótikus aktivitásért az EPS II esetében is az LMW forma a felelős (González és mtsai, 1996b).

Az EPS-ek, mint a sejtfelszíni poliszacharidok szinte mindegyike, feltehetőleg szerepet játszanak a gyökér felszínén való megtapadásban, az infekciós fonál kialakulásában, a gümőinvázióban, a növényi védekezési mechanizmusok kijátszásában (Leigh és Coplin, 1992; Leigh és Walker, 1994). Egyre több kísérleti adat támasztja alá azonban azt a feltételezést, hogy az EPS molekulák specifikus szignálként szolgálnak a növény számára a gümőfejlődés során: (a) az *exoH* mutáns Fix$^-$ fenotípusú, bár az általa termelt EPS-ről csak a szukcinil módosítás hiányzik (Leigh és mtsai, 1987), azaz a molekula szerkezete meghatározó a szimbiótikus aktivitás szempontjából; (b) az *exo* mutációk csak az ugyanazon törzs vad típusú EPS-ével komplementálhatók, más törzsből származóval nem (Battisti és mtsai,1992; Urzainqui és Walker, 1992), azaz a biológiai aktivitás gazdaspecifikus; (c) az EPS már igen alacsony (μM-os) koncentrációban aktív (Battisti és mtsai,1992).

1.3.2.3. A lipopoliszacharidok

A Gram-negatív baktériumok külső membránjának külső felét döntő többségében lipopoliszacharidok (LPS) alkotják. Az LPS molekulákat 3 fő szerkezeti egységre lehet bontani: a poliszacharid típusú O-antigénre, a külső membránt alkotó lipid A régióra, és a kettőt összekötő oligoszacharid magra (Rietschel, 1985). Az O-antigén az adott baktérium törzsre jellemző szerkezetű, ismétlődő oligoszacharid egységekből felépülő homo- vagy heteropolimer. Jellegzetes alkotóelemei a metilált és dezoxi cukrok, uronsavak és heptózok (Carlson és mtsai, 1987). A 3-5 cukoregységből (glükuronsav, galakturonsav) felépülő oligoszacharid mag kovalens kapcsolatban áll az O-antigénnel és a lipid A-val is. Az LPS-ekre általánosan jellemző, hogy az O-antigén mindig egy keto-dezoxi-oktulonsav (KDO) molekulán keresztül kapcsolódik a lipid A cukorrészét alkotó glükózamin lánchoz. A molekula lipid részét β-hidroxi zsírsavak alkotják.

A *Rhizobiumok* sejtfelszíne eltérő LPS összetételű a szabadon élő baktériumban és szimbiótikus körülmények között (Kannenberg és mtsai, 1994), sőt egyazon faj különböző gazdanövényekkel kialakított szimbiózisa során is (Shindu és mtsai, 1990). Ebből arra lehet következtetni, hogy a *Rhizobiumok* sejtfelszíne adaptálódik az eltérő környezeti körülményekhez.

Az LPS bioszintézisért felelős gének feltárása még kezdeti stádiumban van. Ezeddig *R. leguminosarumból* és *R. etliből* azonosították a legtöbb, főképpen az O-antigén és az oligoszacharid mag szintéziséért felelős *lps* gént (de Maagd és mtsai, 1989; Priefer és mtsai, 1989; Cava és mtsai, 89, 90). A lipid A szintézisében résztvevő gének többsége még ismeretlen.

Az *lps* mutációk hatására kialakuló szimbiótikus fenotípus nagymértékben különbözik az egyes gazdanövények esetében. Az indeterminált gümőt létrehozó fajoknál az O-antigén hiánya abnormális infekciós fonál képződéshez, és a bakteroidok korai öregedéséhez vezet. A mutánsok csak igen csökkentett mértékben, vagy egyáltalán nem képesek nitrogénkötésre (de Maagd és mtsai, 1989; Priefer és mtsai, 1989; Perotto és mtsai, 1994).

A determinált gümőt képző fajok esetében az *lps* mutációk hatása sokkal drasztikusabb. Egyes esetekben egyáltalán nem alakulnak ki gümők, máskor bakteroidokat nem tartalmazó, kallusz szerű szövetburjánzások jönnek csak létre (Stacey és mtsai, 1991). Különböző típusú mutánsok vizsgálata alapján úgy tűnik, hogy inkább az O-antigén méretének és mennyiségének, mintsem szerkezetének van döntő szerepe a szimbiózis során. A redukált mennyiségű, de azonos szerkezetű (Cava és mtsai, 1989), és a megrövidült láncú (Perotto és mtsai, 1994) mutánsok szimbiózisban is hibásak, a normális mennyiségű, de eltérő szerkezetű O-antigént termelő mutánsok viszont effektív, nitrogénkötő szimbiózis kialakítására képesek (Kannenberg és mtsai, 1992).

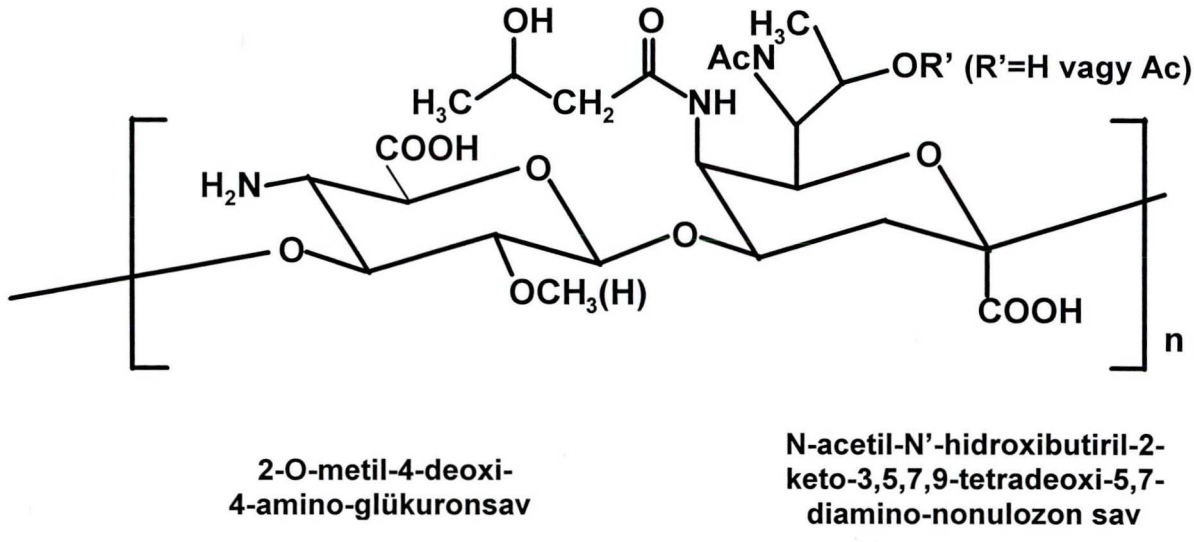
Az LPS biológiai hatásának vizsgálatát nagyban megnehezíti a mutációk pleiotróp fenotípusa. Az O-antigén lánc teljes eltűnése drasztikus változást okoz a sejtfelszín tulajdonságaiban. Az addig mélyebben elhelyezkedő membránkomponensek a felszín közelébe kerülnek, módosítva a sejt antigén tulajdonságait. Megváltozhat a membrán áteresztőképessége bizonyos anyagokkal szemben, ami hatással van a baktérium életképességére. Az *lps* mutációk szimbiótikus fenotípusát tehát egyaránt okozhatják a módosult sejtfelszín által indukált növényi védekezési reakciók (Perotto és mtsai, 1994), és/vagy a megváltozott membrán áteresztő képesség következtében kialakuló szenzitivitás valamely toxikus anyagra (Eisenschenk és mtsai, 1994).

1.3.2.4. A kapszuláris poliszacharidok

A KPS-ek fontos szerepet játszanak a baktérium és környezete kölcsönhatásában, számos patogén mikroorganizmus virulenciájának kialakításában. Szerkezetük, szintézisük megismerése gyógyászati szempontból is lényeges, ezért a kutatások jelenleg legintenzívebben a humánpatogén baktériumokkal *(E. coli, Neisseria meningitidis, Haemophillus influenzae, Salmonella sp.)* folynak.

A KPS molekulákra igen nagyfokú szerkezeti változatosság jellemző, csak *E. coliban* több mint 100 kémiailag eltérő KPS molekulát írtak le. Általában 2-3 speciális cukorból

(N-acetil neuraminsav, N-acetil glükózamin, uronsavak, KDO) álló ismétlődési egységek polimerizációjával képződő homo- vagy heteropolimerek, amelyekhez még további szerves vagy szervetlen molekulák kapcsolódhatnak. Egyes típusaik lipid A, vagy foszfolipid oldallánc segítségével a külső membránhoz horgonyzottak (Whitfield és Walvano, 1993).



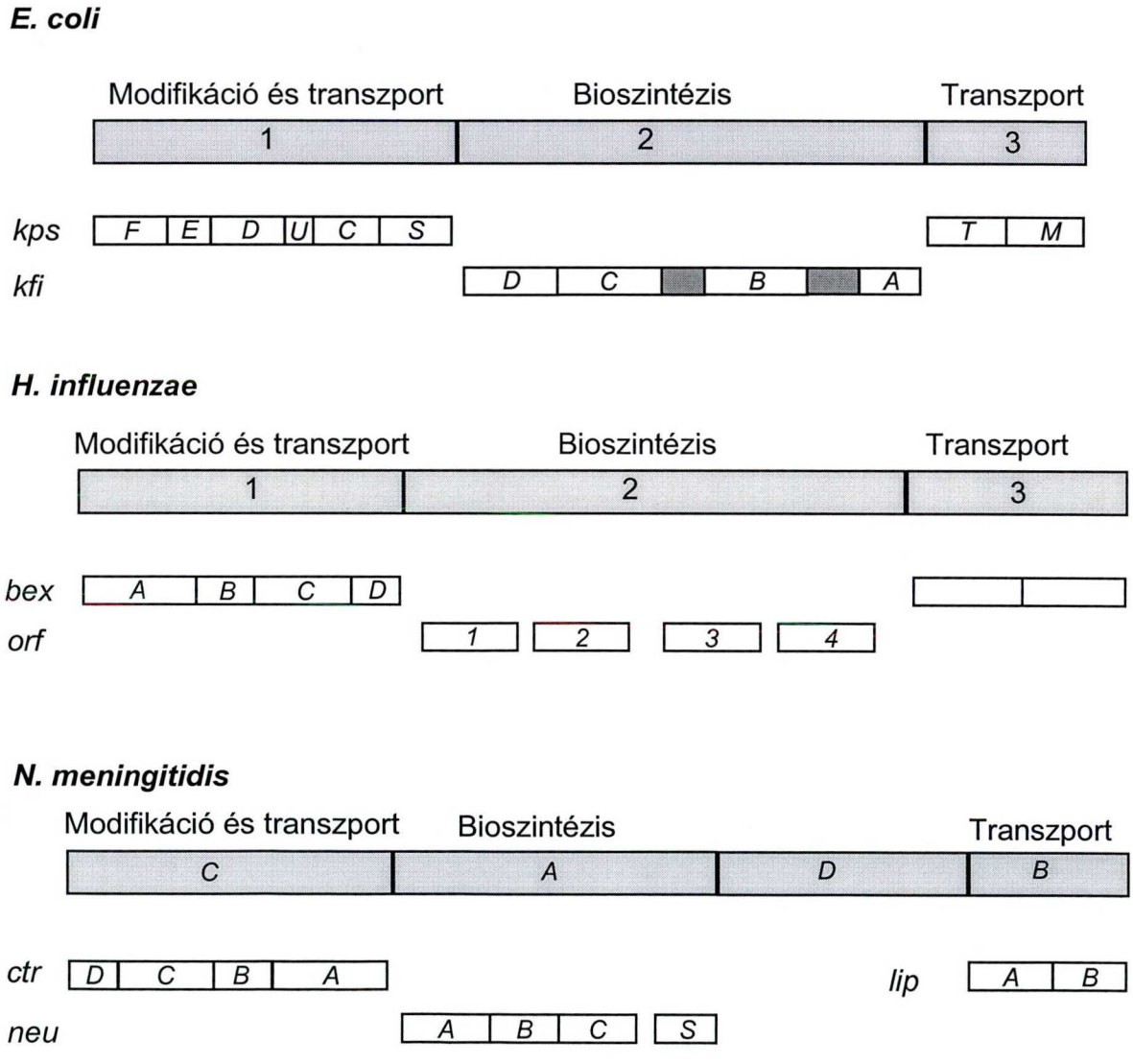
6. ábra. A *R. meliloti* KPS feltételezett szerkezete. Ac=acetil csoport (B. Reuhs, személyes közlés).

A KPS szintézisért felelős gének 3 szomszédos, eltérő funkciójú régióba tömörülnek (7. ábra). Az 1. és 3. régió génjei erős szerkezeti és funkcionális konzerválódást mutatnak az eddig vizsgált összes G-negatív baktérium esetében (Frosch és mtsai, 1991). Az itt található gének a szerotípusok között funkcióvesztés nélkül kicserélhetőek. Az általuk kódolt fehérjék a poliszacharid polimerizációja után szükséges, eddig még nem teljesen feltárt funkciókat látnak el, valamint a KPS transzportjában vesznek részt (Boulnois és Roberts, 1990). A két konzerválódott régió által közrefogott 2. géncsoport kódolja a poliszacharid szintézisért felelős enzimeket, az itt található gének minden szerotípusban eltérőek (Roberts és mtsai, 1988).

Számos *Rhizobium* (Reuhs és mtsai, 1993), *Bradyrhizobium* (Eggleston és mtsai, 1996), és *Agrobacterium* (Reuhs és mtsai, 1997) sejtfelszínén mutattak ki KPS molekulákat. A

Rhizobiumok KPS-e (6. ábra) általában KDO-ból és valamilyen hexóz molekulából álló diszacharid ismétlődési egységekből épül fel, amelyhez még további negatív töltést biztosító szubsztituensek kapcsolódnak (Forsberg és Reuhs, 1997).

A rhizobiális KPS szimbiótikus funkciója sok tekintetben megegyezik a többi sejtfelszíni poliszacharidéval. Feltehetőleg szerepet játszik a gyökérszőrökön való megtapadásban, az infekciós fonál képzésben, a gümőinvázióban, a növényi védekezési reakciók elnyomásában.



7. ábra. A KPS szintézisért felelős gének organizációja néhány G⁻ baktériumban

1.4. A *Rhizobiumok* és a növényi védekezési reakciók

A növények a mikrobiális fertőzésekre védekezési reakciókkal válaszolnak. Megnövekszik a fitoalexinek és a flavonoidok termeléséért felelős fenilpropanoid bioszintézisútba tartozó fenilalanin-ammónia liáz, salkon szintáz, és salkon izomeráz, valamint a peroxidáz enzimek és az ún. PR (pathogenesis related) fehérjék termelése. Az ún. hiperszenzitív reakciók (HR) keretében fenolos és peroxidos anyagcseretermékek szabadulnak fel, minek következtében a fertőzött sejtek elpusztulnak (Baron és Zambryski, 1995).

A gümőinvázió során a *Rhizobiumok* behatolnak a növény szöveteibe, sejtjeibe. A szimbiózis kutatás egyik legizgatóbb kérdése: hogyan ismerik fel a szimbiózis partnerei egymást, hogyan különbözteti meg a gazdanövény a szimbionta baktériumot a kórokozótól. A patogén és a szimbionta baktériumok egyaránt indukálják a védekezési mechanizmusokat, a reakciók időbeni lefutása és erőssége azonban a két esetben különböző (Baron és Zambryski, 1995). A szimbiózis kialakulása során a védekezési reakciók később kezdődnek és hamar lecsengenek, feltehetőleg azért, mert a szimbionta baktériumok képesek visszaszorítani ezeket (McKhann és Hirsch, 1994). Az is lehetséges, hogy a védekezési reakciók egy részével a növény a képződő gümők számát szabályozza. A vad típusú baktériummal fertőzött növények esetében ugyanis a megkezdett infekciós fonalak döntő többsége HR reakciót mutató nekrotikus sejtekben végződik (Vasse és mtsai, 1993).

A Nod-faktorok hatására lucerna gyökerekben a fenilpropanoid bioszintézis út enzimeinek (salkon szintáz, salkon reduktáz és izoflavon reduktáz) megnövekedett aktivitása figyelhető meg, az indukció kinetikája azonban különbözik a hasonló kémiai szerkezetű, patogénekre jellemző oligokitin molekulák által kiváltott választól (Savoure és mtsai, 1997). Ezeknek az enzimeknek a megnövekedett szintje azonban nem feltétlenül jelent védekezési reakciót, hiszen egyes *nod* gén indukáló anyagok szintén ezen a bioszintézis úton keresztül szintetizálódnak (Philips és mtsai, 1993).

Régóta ismert, hogy a humánpatogén baktériumok sejtfelszíni poliszacharidjaik hiányában elveszítik fertőzőképességüket, mivel ezek a molekulák védelmet jelentenek a gazdasejt védekezési rendszerei, úgymint az antigén serkentette fagocitózis és a komplement rendszer ellen (Cross, 1990). A *Rhizobiumok* poliszacharidjainak egyik lehetséges feladata szintén a növény védekezési rendszerének kijátszása. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy (a) az EPS, LPS vagy KPS génekben mutáns *Rhizobiumok* általában Fix$^-$ fenotípusúak, mivel az infekciós fonalak korán elhalnak és a mutáns baktériumok nem jutnak be a gümősejtekbe; (b) ilyen EPS (Niehaus és mtsai, 1993; Parniske és mtsai, 1994), és LPS (Perotto és mtsai, 1994) szintézisben hibás *Rhizobiumokról* kimutatták, hogy indukálják a növényi védekezési rendszereket. A KPS és a védekezési gének kapcsolatáról az 5.1. fejezetben lesz szó.

1.2. Kutatási előzmények: A *R. meliloti* 41 *fix-23* régiójának izolálása és kezdeti analízise

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

A csoportban már korábban izolált Fix$^-$ *R. meliloti* mutánsokat (Forrai és mtsai, 1983) Putnoky Péter és mtsai. csoportosították aszerint, hogy a szimbiózis a gümőfejlődés melyik stádiumában áll le az adott mutáció hatására (Putnoky és mtsai, 1988). Érdeklődésük elsősorban azon mutánsok felé fordult, amelyek gümőiben nem aktiválódnak a szimbiózis specifikus növényi gének, valamint a baktérium nitrogénkötési génjei (*nif*) sem fejeződnek ki, azaz a gümőfejlődés még ezen lépések előtt leáll. Ennek egyik oka az lehet, hogy a növény nem kapja meg az adott szakaszban szükséges bakteriális szignált. E mutánsok segítségével lehetőség nyílhat olyan bakteriális gének azonosítására, melyek a növény számára küldött, a Nod-faktorral analóg, de későbbi stádiumban szükséges jelmolekula előállításában vesznek részt.

Felhasználva a korai stádiumú Fix$^-$ mutánsokat, *R. meliloti* génbankból komplementáció segítségével izoláltak 4 különböző, *fix* géneket hordozó szakaszt (Putnoky és mtsai, 1988). Az egyik régióról (*fix-23*) kiderült, hogy a régióba térképezhető *fix* mutációk egyben rezisztenciát okoznak a *R. meliloti* 41 törzs specifikus bakteriofágjával, a *16-3* fággal szemben. E rezisztencia okának az bizonyult, hogy a *fix-23* mutáns baktériumok sejtfelszínén nem képesek megtapadni a fágrészecskék (Putnoky és mtsai, 1990). A jelenség feltételezhető magyarázata, hogy a fág receptora megváltozik a régióba történő Tn*5* beépülése következtében. Ez esetben ugyanez a struktúra, vagy ennek egy része játszhat szerepet a szimbiótikus gümőfejlődés során is.

A *fix-23* régióban lévő mutációk csak Exo$^-$ baktérium törzsben (AK631) okoztak Fix$^-$ fenotípust, az Exo$^+$ *R. meliloti* 41-ben nem. A jelenség egy lehetséges magyarázata az,

hogy az Exo⁻ AK631-ben az a struktúra pótolja az EPS szerepét, amit a *fix-23* régió is meghatároz. Az egyes *exo* és *fix-23*, valamint a kettős *exo-fix-23* mutánsok előállításával és vizsgálatával bizonyítást nyert, hogy az EPS és a *fix-23* régió által meghatározott struktúra valóban képes ugyanazt a szerepet ellátni a szimbiótikus gümőfejlődés során, a *R. meliloti* 41 minden vizsgált gazdanövényén (Putnoky és mtsai 1990). A szimbiótikus funkciókért felelős géneket a *fix-23* régión végrehajtott irányított Tn5 mutagenezis segítségével határolták be (Putnoky és mtsai 1990).

A *fix-23* régió bal oldalán található első komplementációs csoport (8. ábra) szerkezeti és funkcionális analízisét Petrovics György végezte. Vizsgálatai során a következő jelentősebb következtetésekre jutott:

Megállapította, hogy a *fix-23* gének olyan sejtfelszíni struktúra felépítésében vesznek részt, ami poliszacharid természetű fágreceptorként szolgál. Izolálta és tisztította a struktúrát, melynek kromatográfiás vizsgálatai szerint a *fix-23* gének által meghatározott molekula az LPS frakcióban található KDO tartalmú poliszacharid. Meghatározta a *fix-23* régió első komplementációs egységének nukleotid sorrendjét. A komputeres analízis szerint a feltételezett fehérjetermékek különböző zsírsav szintáz, és poliketid szintáz enzimekkel mutatnak homológiát. A szekvencia analízis alapján feltételezett hat új zsírsav szintáz génbe épülő Tn*5* inszerció nem okozza a baktérium pusztulását, vagyis ezek a gének nem a *R. meliloti* esszenciális zsírsav szintéziséért felelősek. A kísérleti eredmények alapján valószínűsíthető volt, hogy ezen gének egy szimbiózis specifikus sejtfelszíni struktúra zsírsav részének felépítésében vesznek részt (Petrovics és mtsai, 1993). A feltételezett LPS molekula biokémiai vizsgálatára csoportunk együttműködést alakított ki a Complex Carbohydrate Research Centerben (Athens, Georgia, USA) található, R. Carlson vezette csoporttal, amelynek fő kutatási területe a bakteriális sejtfelszíni poliszacharidok analízise. Az AK631 törzs által termelt poliszacharidok részletes biokémiai vizsgálata során kiderült, hogy a *fix-23* régió nem LPS, hanem egy *R. melilotiban* még nem azonosított kapszuláris poliszacharid szintéziséhez szükséges (Petrovics és mtsai, 1993;

Reuhs és mtsai, 1993). Megállapították, hogy a *fix-23* régió első komplementációs csoportjába térképeződő Fix$^-$ mutánsok sejtfelszínéről hiányzik ez a KPS molekula (Petrovics és mtsai, 1993). Ez volt az első bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a KPS szerepet játszik a szimbiózis kialakulásában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

Ennek ismeretében tűztem ki célul a KDO-PS termelésben résztvevő további gének izolálását és analízisét, az általuk meghatározott bakteriális jelmolekula vizsgálatát.

A célt az alábbi részfeladatok megoldása során próbáltuk elérni:

-A *fix-23* régió jobb oldalán található 4.5 kb-nyi DNS szakasz szubklónozása

-Az itt található komplementációs egységek szekvenciájának meghatározása

-A kapott szekvenciák komputeres analízise, a lehetséges kódoló nyitott leolvasási keretek (ORF-ek) azonosítása

-A feltételezhető fehérje termékek összehasonlítása adatbázisokban tárolt aminosav szekvenciákkal.

-A *R. meliloti 41* törzs infekciós képességében fontos szerepet játszó KDO-PS molekulát kódoló további genomi régiók azonosítása, izolálása, és az azonosított gének szerepének megismerése a *fix-23* régiónál ismertetetett munkamenethez hasonló módon.

-Ezen gének által meghatározott sejtfelszíni poliszacharid izolálása és jellemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok

A disszertációban szereplő baktérium törzseket, bakteriofágokat és plazmidokat az 1. táblázatban tüntettük fel. A szövegben külön nem említett, *rkp-2* és *rkp-3* régióba térképeződő Tn5 transzpozon inszerciók elhelyezkedése a 18. és 19. ábrán látható.

1. táblázat. Baktérium törzsek, plazmidok.

elnevezés	jellemzők	hivatkozás/forrás
Escherichia coli		
JM109	*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1* (*lac-proAB*) (F *traD36proAB lacI^{q}Z M15*)	Yanisch-Perron és mtsai, 1985
HB101	*hsdS hsdM pro leu thi gal lacY recA str*	Boyer és Roulland -Dussoix, 1969
Rhizobium meliloti		
Rm41	vad típus, Nod$^+$Fix$^+$	Szende és Ördögh, 1960
AK631	Rm41 *exoB*, Nod$^+$Fix$^+$	Kondorosi Ádám
PP551	AK631 *rkp-1* ::Tn*5*	Putnoky és mtsai, 1990
PP590	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP608	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP618	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP633	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP634	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP671	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
PP674	AK631 *rkp-1* ::Tn5	Putnoky és mtsai, 1990
Rm5830	AK631 *rkpZ* ::Tn5	Williams és mtsai,1990

AT231	AK631 *rkp-2* ::Tn*5*	Kereszt Attila
AT211	AK631 *rkp-3* ::Tn*5*	Kereszt Attila
AT212	AK631 *rkp-3* ::Tn*5*	Kereszt Attila
AT234	AK631 *rkp-3* ::Tn*5*	Kereszt Attila
AT232	AK631 *rkp-3* ::Tn*5*	Kereszt Attila
AT233	AK631 *rkp-3* ::Tn*5*	Kereszt Attila

Plazmidok

pUC19	Ap^R	Yanisch-Perron és mtsai, 1985
pLAFR1	Tc^R, széles gazdaspektrumú kozmid vektor	Friedman és mtsai, 1982
pPP428	pLAFR1::*rkp-1* régió	Putnoky és mtsai, 1990
pPP775	pUC19::*rkp-1*, II., III. komplementációs egység	Putnoky és mtsai, 1990
pPP933	pUC19::*rkp-1*, IV. komplementációs egység	Putnoky és mtsai, 1990
pAT330	pLAFR1::*rkp-2* régió	Kereszt Attila
pAT399	pLAFR1::*rkp-3* régió bal oldala	Kereszt Attila
pAT401	pLAFR1::*rkp-3* régió jobb oldala	Kereszt Attila

Bakteriofágok

M13mp18/19	egyszálú fág vektor	Yanisch-Perron és mtsai, 1985
16-3	*R. meliloti* 41 fág	Orosz László

3.2. Mikrobiológiai eljárások

Az *E. coli* törzseket LB tápközegben (Maniatis és mtsai, 1982) 37 °C-on, a *R. meliloti* törzseket YTA (Orosz és mtsai, 1973) vagy 1 mM NH_4Cl-dal kiegészített GTS (Kiss és mtsai, 1979) táptalajokon 30 °C-on növesztettük. A rezisztencia-markert hordozó törzsek

táptalaja a 2. táblázatban feltüntetett koncentrációban tartalmazta a megfelelő antibiotikumot.

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

Antibiotikum	*E. coli*	*R. meliloti*
tetraciklin	15	15
ampicillin	100	-
kanamicin	50	200
streptomicin	100	200

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

A kompetens *E. coli* sejtek előállítására Inoue és mtsai (1990) módszerét alkalmaztuk. A logaritmikus fázisig (OD_{600}=0.5-0.6) felnövesztett 200 ml baktériumtenyészetet 0 °C-ra lehűtöttük, centrifugáltuk, majd a sejteket 80 ml 0 °C-os TB pufferben (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, pH=6.7) szuszpendáltuk. A szuszpenziót 10 percig 0 °C-on inkubáltuk, majd újbóli centrifugálást követően a sejteket 20 ml, 7% dimetil-szulfoxidot tartalmazó TB pufferben szuszpendáltuk. Az így előállított kompetens sejteket vagy azonnal transzformáltuk, vagy felhasználásukig -80 °C-on tároltuk. A sejtekbe a DNS-t hősokk (37 °C, 2 perc), majd 1 óra 37 °C-on való növesztés segítségével juttattuk be.

3.3. Rekombináns DNS-technikák

A plazmid és egyszálú DNS-ek tisztítását, a restrikciós enzim emésztéseket, az agaróz gélelektroforéziseket, valamint a DNS fragmentek izolálását és klónozását Maniatis és mtsai (1982) által leírt módszereket alapul véve végeztük el. A klónozási munkák során alkalmazott enzimeket és vegyszereket a gyártó cégek javaslatait szem előtt tartva alkalmaztuk.

3.4. A DNS bázissorendjének meghatározása

A DNS-ek nukleotid sorrendjét a Sanger és mtsai (1977) által kidolgozott dideoxi lánctermináció technikán alapuló módszerrel állapítottuk meg. Templátként M13mp18 illetve M13mp19 vektorba klónozott átfedő szubklónok egyszálú fág DNS-ét használtuk. A szekvenálási reakciókhoz a United States Biochemicals (Cleveland, USA) Sequenase kitjét és [^{35}S]-dATP-t alkalmaztunk a gyártó előírásai szerint. A reakciók során M13-specifikus (-40 és reverz), illetve 18 nukleotidból álló specifikus primereket használtunk. A Tn5 transzpozon beépülési helyeit határoló DNS-szakaszok bázissorrendjének meghatározására egy Tn5-specifikus oligonukleotidot (5'-GCAAAACGGGAAAGGTTCCG-3') alkalmaztunk. A szekvenálási reakciókat 25% formamidot tartalmazó, 5.5-7.5%-os poliakrilamid gélen választottuk el TBE puffer jelenlétében.

A DNS szekvencia adatok összesítését és analízisét a PC/Gene (tervezte Amos Bairoch, IntelliGenetics), a többszörös szekvencia összehasonlításokat, valamint a kodon-preferencia vizsgálatokat az UWGCG (Devereux és mtsai, 1984) programcsomagok segítségével végeztük el. A fehérje és DNS szekvenciák adatbankokkal (Swiss-Prot Release 29.0, PIR Release 41.0 és GenBank Release 84.0) való összevetésére az interneten keresztül elérhető (www.ncbi.nlm.nih.gov), Altschul és mtsai (1990) által kifejlesztett BLAST programokat (National Center for Biotechnology, National Library of Medicine, Bethesda, Md, USA) használtuk fel.

3.5. A β-galaktozidáz enzim aktivitásának mérése

A *lacZ* fúziót tartalmazó sejtekben termelődött β-galaktozidáz enzim aktivitásának mérését Miller (1972) módszere alapján végeztük el o-nitrofenil-β-galakto-piranozid (ONPG) szubsztrát felhasználásával. Az enzim aktivitást a reakció végtermékeként keletkező o-nitrofenol sárga színének 420 nm-en mért optikai denzitása alapján Miller egységekben számítottuk ki (Miller 1972).

3.6. Növényi teszt

A növényi teszthez használt *Medicago sativa* ssp. *sativa* L. var Nagyszénási magvakat 95%-os etanolban (2 perc) és 0.2%-os $HgCl_2$ oldatban (10 perc) sterileztük. Többszöri steril desztillált vizes öblítés után a magokat 1%-os vizes agar talajon egy éjszakán át sötétben csíráztattuk. A csíranövényeket nitrogénmentes Gibson tápoldatot (Gibson, 1980) és 1,5% agart tartalmazó csövekbe helyeztük, és üvegházban neveltük (16 óra fényperiódus, 22 °C) a kísérlet kiértékeléséig.

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

3.7. Kapszuláris poliszacharidok izolálása

A bakteriális sejtfelszíni poliszacharidokat Reuhs és mtsai (1993) által továbbfejlesztett módszerrel tisztítottuk. A 3 ml baktérium tenyészet (OD_{600}=0,9) forró fenolos extrakciójával (500 µl 45%-os fenol+500µl H_2O) nyert vizes fázist desztillált vízzel szemben dializáltuk. Nagy mennyiségű poliszacharid izolálása esetén 5-15 liter baktérium kultúrából indultunk ki, és az előbbiekben leírt módszert alkalmaztuk, majd a vizes fázist fagyasztva szárítottuk (liofilizáltuk). Az így nyert mintát Sephadex G-150 oszlopon (0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris base, 0.25% deoxikolsav, pH 9.25) tisztítottuk tovább. A frakciók keto-deoxi-oktulonsav (KDO) tartalmát a tiobarbiturát módszerrel (Karkhanis és

mtsai, 1978), az összes cukor tartalmat a fenol-kénsav teszttel (Dubois és mtsai, 1956) határoztuk meg.

3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A fenti módszerrel előállított minták 1μl-ét 18 %-os poliakrilamid gélen megfuttattva a kapszuláris és lipopoliszacharid molekulákat különböző molekulatömegük alapján szétválasztottuk. Az LPS mintázatot a gélek ezüst festésével, míg a KPS-eket az Alcian kék és ezüst festés együttes, perjodátos oxidáció nélküli alkalmazásával tettük láthatóvá (Reuhs és mtsai, 1993; Petrovics és mtsai, 1993). A specifikus festési eljárásoknak köszönhetően a minták LPS és KPS mintázata a két vegyületcsoport előzetes szétválasztása nélkül is külön-külön vizsgálható volt.

3.1. Immunoblot analízis

Az immunfestési eljáráshoz a PAGE géleken méret szerint elválasztott mintákat Nytran+ (Schleicher and Schuell, Keene, NH) membránra vittük át Trans-Blot SD készülék (Bio-Rad, Richmond, CA) segítségével. A membránokat a *R. meliloti* baktérium sejtek ellen nyúlban termelt antitestekkel inkubáltuk, majd ezeket kecskéből származó, alkalikus foszfatázhoz kapcsolt anti-IgG ellenanyagokkal (Sigma A-9919) kezeltük, végezetül 5-bromo-4-chloro-3-indolyl foszfát és nitrokék-tetrazolium segítségével festettünk meg (Reuhs és mtsai, 1993; Petrovics és mtsai, 1993).

3.2. Mágneses magrezonancia vizsgálat (NMR)

A ^{1}H-NMR analízist Bruker AM 250-es készülék segítségével végeztük. A mérést $^{2}H_2O$-ben, 296 K-n hajtottuk végre.

3.3. Enzimkötött immun-adszorpciós (ELIZA) vizsgálat

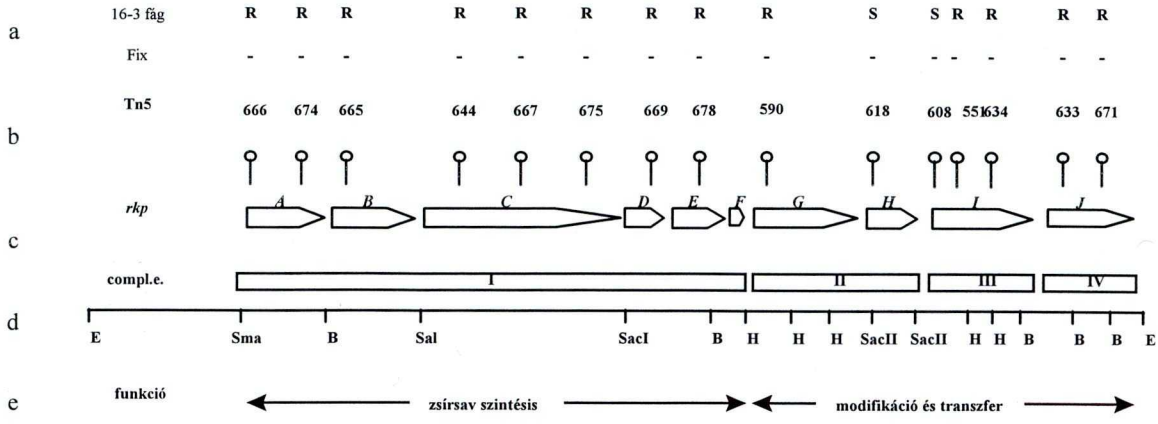
A poliszacharid minták ELIZA vizsgálatát Fuhrmann és Wollum (1985) módszere alapján végeztük. A mutáns és vad típusú baktériumokat OD_{600}=0,5-ig növesztettük TA tápfolyadékban, majd a sejteket burkoló pufferben megmostuk, majd az így nyert sejt szuszpenziót egy 96-os mikrotiter lemezre osztottuk szét 0,1 ml-enként, amelyet egy éjszakán át 4 °C-on tároltunk. Másnap a mintákat háromszor mostuk Tween tartalmú fiziológiás foszfát pufferben (PBS-Tween) majd minden egyes üregbe 0,1 ml ezerszeresére hígított ellenanyagot adtunk, amelyet a vad típusú (LPS^+, KPS^+) *R. meliloti* 41 törzs sejtfelszíne ellen készítettünk. Az ellenanyagot előzőleg PP674 baktériummal preadszorbeáltattuk. Mivel ez a mutáns nem termel KPS-t csak LPS-t, a preadszorpció során az LPS specifikus ellenanyag részecskéket eltávolítottuk, így a már csak KPS molekulákat felismerő ellenanyagot nyertünk ki. Három óra szobahőmérsékleten történő inkubáció után ismét mosás, majd kecskéből származó, alkalikus foszfatázhoz kapcsolt anti-IgG ellenanyaggal (Sigma A-9919) való kezelés következett egy éjszakán át 4 °C-on. Ismételt mosás után a mintákat a megfelelő szubsztrát hozzáadásával megfestettük, majd a megjelenő színt 492 nm-es hullámhosszon detektáltuk.

4. EREDMÉNYEK

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

A *fix-23* régió jobb oldalán elhelyezkedő további három komplementációs csoportban található gének megismeréséhez meg kellett határoznunk a korábban irányított Tn5 mutagenezis segítségével behatárolt régió nukleotidsorrendjét. E célból a pPP775 és pPP933 plazmidokból a 7. ábrán látható restrikciós endonukleáz hasítóhelyeket felhasználva átfedő fragmenteket szubklónoztunk M13mp18 és mp19 egyszálú fágvektorokba. A mutációk pontos helyének megállapítása valamint további szekvencia adatok nyerése érdekében a Tn5 illetve Tn10LK transzpozonokat megfelelően megválasztott restrikciós enzimek segítségével kettéhasítottuk, és IR elemeiket az inszerciókkal határos DNS-darabokkal együtt pUC19 vektorba építettük be. Az így nyert átfedő szubklónok nukleotid-sorrendjét mindkét szálon meghatároztuk (8. ábra).

A DNS-szekvenciát a PC/Gene számítógépes programcsomag (Amos Bairoch, IntelliGenetics) felhasználásával analizáltuk. Azonosítottunk a lehetséges fehérje kódoló régiókat, az úgynevezett nyitott leolvasási kereteket (Open Reading Frame, ORF). Az UWGCG szekvencia analízis szoftver csomag (Devereux és mtsai 1984) és egy, a már ismert *R. meliloti* gének szekvencia adatai alapján összeállított kodonhasználati táblázat segítségével megvizsgáltuk, hogy mely ORF-ek rendelkeznek *R. meliloti*ra jellemző kodonhasználattal. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeképpen négy, egy irányba átíródó, tipikus *R. meliloti* kodonhasználatot mutató ORF-et sikerült azonosítanunk (8.-9. ábra). Az *E. coli* konszenzus szekvenciát alapul véve, az ORF-ek előtt megkerestük a lehetséges riboszóma-kötő helyeket (10. ábra). Az ORF-eket nem előzte meg tipikus-10 és -35 promóter szekvencia, és nem követte semmiféle jellegzetes transzkripciós terminátor.



8. ábra. A *fix-23* régió fizikai-genetikai térképe. (a) A mutánsok szimbiótikus nitrogénkötő képessége (Fix), és 16-3 fággal szembeni rezisztenciája (R) illetve szenzitivitása. (b) A függőleges vonalak a Tn5 transzpozonok beépülési helyét jelzik. (c) A komplementációs csoportok és a feltételezett ORF-ek. (d) A szubklónozás során használt restrikciós endonukleázok hasítóhelyei: B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, SacI = *Sac*I, SacII = *Sac*II, Sal = *Sal*I, Sma = *Sma*I. (e) A régióban található nagyobb géncsoportok feltételezett funkciója.

Nemrégiben Reuhs és mtsai. (1995) az *rkp* elnevezést javasolták a *Rhizobiumok* kapszuláris poliszacharid szintézisében résztvevő génjeinek a megnevezésére. Csatlakozva az újfajta nomenklatúrához a *fix-23* régió első komplementációs csoportjában előzőleg azonosított 6 ORF-et *rkpABCDEF*-nek neveztük át, míg a dolgozat anyagát képező további ORF-eket folytatólagosan *rkpGHIJ*...stb.-nek kereszteltük el (Kiss és mtsai, 1997a). Követve az ORF-ek elnevezését, a dolgozat anyagát képező szekvencia számozása nem egytől kezdődik. Az itt megadott nukleotid pozíciók a *fix-23* régió elejétől értendőek.

8. ábra. (következő lap) A *fix-23* régió nukleotid szekvenciája. A szekvencia alatt feltüntettük a régióban kódolt proteinek aminosav-sorrendjét. A konzerválódott motívumokat (piridoxál-foszfát kötőhely, NAD(P)H kötőhely, alkohol-dehidrogenáz motívum) sötétebb szedéssel jelöltük. A csillag stop kodont jelképez. A start kodonokat szürke téglalapokkal, a lehetséges riboszóma-kötő helyeket aláhúzással jelöltük. A fekete nyilak az adott Tn5 beépülésének pontos helyét mutatják. A *fix-23* régió komplett szekvenciája az EMBL adatbázisban található meg az X64131 hivatkozási szám alatt.

```
      7570       7580       7590       7600       7610       7620
CGTCATGTCGGAGCGGACAAGGAAAAAGCACTGAGTCAATGAGCAACGATGGAAACGGCC

      7630       7640       7650       7660       7670       7680
AGACCTTCCCGAAAATGAACAGCAGTCTCAAGGAGAGCCTGTTGGACAGGATGCGGAACA
                                                    M  R  N
                                                 rkpG

      7690       7700       7710       7720       7730       7740
CGCATCAATCGTCCGAGCGCAACCGGATGGCGCGCTCGGAGCGGGAGTTGCCGCCGGCTC
T  H  Q  S  S  E  R  N  R  M  A  R  S  E  R  E  L  P  P  A

      7750       7760       7770       7780       7790       7800
CGCGTCGCCAGCAGGCGCGTTTCGAGGATCTGCCCGAGTATAAGCAGGTCCTTACGCAGA
P  R  R  Q  Q  A  R  F  E  D  L  P  E  Y  K  Q  V  L  T  Q

      7810       7820       7830       7840       7850       7860
AGATCGCCAGCGAGCAGCTCGGCATCGCCAACCCGTTCTACCGGCCGCATCAGACGGCAG
K  I  A  S  E  Q  L  G  I  A  N  P  F  Y  R  P  H  Q  T  A

      7870       7880       7890       7900       7910       7920
CCGGTGCGACGACGATGATCGATGGCCGCAAGCTGATCAACTTCGCCTCCTATGACTATC
A  G  A  T  T  M  I  D  G  R  K  L  I  N  F  A  S  Y  D  Y

      7930       7940       7950       7960       7970       7980
TCGGGCTCAACCGGCATGCTCACGTCCTCGAGCGGGCGCGCGAGACGATCGCCGGCTTCG
L  G  L  N  R  H  A  H  V  L  E  R  A  R  E  T  I  A  G  F

      7990       8000       8010       8020       8030       8040
GGATTTCCGCGTCGGCGAGCCGCCTCGTTGCCGGCGAACGGCCGCAGCATGTGGAGCTCG
G  I  S  A  S  A  S  R  L  V  A  G  E  R  P  Q  H  V  E  L

      8050       8060       8070       8080       8090       8100
AAGAAAAGATCGCGCAATTCTACGGCGTTGATGCCGCCGTCTGTTTCGTAAGCGGCTACC
E  E  K  I  A  Q  F  Y  G  V  D  A  A  V  C  F  V  S  G  Y

      8110       8120       8130       8140       8150       8160
TGACGAATGTCGCCGCGATCAGCTGCCTGATGGGGCCGAAGGACCTCGTCATCCACGACG
L  T  N  V  A  A  I  S  C  L  M  G  P  K  D  L  V  I  H  D
         Tn5[590]

      8170       8180       8190       8200       8210       8220
AGTTCATCCACAACAGCGCGCTCGCCGGGATCAAGCTTTCAGGTGCGACACGCCGCTTCT
E  F  I  H  N  S  A  L  A  G  I  K  L  S  G  A  T  R  R  F

      8230       8240       8250       8260       8270       8280
TCAAGCACAACGACACCGCGGATCTCGAGCATGTCCTGCGCACCGTCGCCGGTGACTACC
F  K  H  N  D  T  A  D  L  E  H  V  L  R  T  V  A  G  D  Y
```

```
      8290       8300       8310       8320       8330       8340
GGCGCATCCTGGTGATCGTCGAGGGCATCTACTCGATGGACGGCGACGTCGCCAATCTGC
R  R  I  L  V  I  V  E  G  I  Y  S  M  D  G  D  V  A  N  L

      8350       8360       8370       8380       8390       8400
CGGCGCTTCTGAAGCTCAGGGCCGAATACGGCTTCTGGCTGATGGTCGACGAGGCGCATT
P  A  L  L  K  L  R  A  E  Y  G  F  W  L  M  V  D  E  A  H

      8410       8420       8430       8440       8450       8460
CGCTCGGGGTCCTCGGCCGGCACGGCAGGGGCCTCGCCGAACATTTCGGGGCCGATCCGC
S  L  G  V  L  G  R  H  G  R  G  L  A  E  H  F  G  A  D  P

      8470       8480       8490       8500       8510       8520
ACGAAGTCGACATCTGGATGGGAACATTGTCGAAGACGACGTCGAGCTGCGGCGGCTACA
H  E  V  D  I  W  M  G  T  L  S  K  T  T  S  S  C  G  G  Y
                      piridoxál foszfát kötőhely

      8530       8540       8550       8560       8570       8580
TAGCAGGAAGCGCCGCCCTGGCGGCCGTGCTAAAGGCATCTGCCGGCGGCTTCGTCTATA
I  A  G  S  A  A  L  A  A  V  L  K  A  S  A  G  G  F  V  Y

      8590       8600       8610       8620       8630       8640
GCGTCGGCCTCGCGCCCGTGCTTGCCGCATCCGCGGTCGCCAGCCTCGACATCCTGGCAA
S  V  G  L  A  P  V  L  A  A  S  A  V  A  S  L  D  I  L  A

      8650       8660       8670       8680       8690       8700
GCGAACCGGAACGCACGGCGGCGGTGAGACGCAACGGCAGCCTGTTCCTGAAGCTTGCCA
S  E  P  E  R  T  A  A  V  R  R  N  G  S  L  F  L  K  L  A

      8710       8720       8730       8740       8750       8760
AGGAGGCCGGCCTCGATACCGGGCTGAGCGGCGGCTTTTCGGTCGTGCCTGTCATCGTCG
K  E  A  G  L  D  T  G  L  S  G  G  F  S  V  V  P  V  I  V

      8770       8780       8790       8800       8810       8820
GGGATTCGCTGCGCGCCGTCCAGCTTTCGAACGACCTGCTCGCCGCCGGCAACGTCCTGC
G  D  S  L  R  A  V  Q  L  S  N  D  L  L  A  A  G  N  V  L

      8830       8840       8850       8860       8870       8880
CGATCATCCACCCGGCGGTGCCGGAAGGACAGGCGCGCCTTCGCGTTCTTCATCACCTGC
P  I  I  H  P  A  V  P  E  G  Q  A  R  L  R  V  L  H  H  L

      8890       8900       8910       8920       8930       8940
GACCACACCGAGGAACAGATCCGCCGCACCGTCACATTGGAGCTGAACGCCTGAAGGATC
R  P  H  R  G  T  D  P  P  H  R  H  I  G  A  E  R  L  K  D

      8950       8960       8970       8980       8990       9000
TCACCGACCGCAATTTCGGCCTCGGGCGCGTCGATATCGAGAAGATGCTGAGTGCGCTCT
L  T  D  R  N  F  G  L  G  R  V  D  I  E  K  M  L  S  A  L
```

```
      9010       9020       9030       9040       9050       9060
CGGCATGCTGACCACCAGCCGCCGCACGGCCGCCAACGGGTTCGTCCATGACACATGTGA
S  A  C  *                                          M  T  H  V
                                                   rkpH

      9070       9080       9090       9100       9110       9120
TCATCACCGGCGGCTCGAGCGGAATTGGCCTCGCGGTCGCCTCGATCTACGCGGCCCGCA
I  I  T  G  G  S  S  G  I  G  L  A  V  A  S  I  Y  A  A  R
         NAD(P)H kötőhely

      9130       9140       9150       9160       9170       9180
GCCGCGTCTCTCTTGTCGCACGCTCGGCCGATCTTCTGGAGAAGGCAGCACAGAAGCTGG
S  R  V  S  L  V  A  R  S  A  D  L  L  E  K  A  A  Q  K  L

      9190       9200       9210       9220       9230       9240
TAGCCGAACACGGTCTCGAGGCCGGAGCGGTCCGCATAGAGGCCGCCGATGTTTCCAAAG
V  A  E  H  G  L  E  A  G  A  V  R  I  E  A  A  D  V  S  K

               Tn5[618]
      9250       9260       9270       9280       9290       9300
GAGAGGAGATCGAGGCCGCGGTCTTCCGCTGTGTGGATGCGTTCGGACCCTGCGACGTTC
G  E  E  I  E  A  A  V  F  R  C  V  D  A  F  G  P  C  D  V

      9310       9320       9330       9340       9350       9360
TCGTGACCTCGGCAGGCGTCGTCGAACCGGCGCCATTCGAGGCGATGCAGGGATCGGCCT
L  V  T  S  A  G  V  V  E  P  A  P  F  E  A  M  Q  G  S  A

      9370       9380       9390       9400       9410       9420
TCCACCGGCAGATGGAAACGAACTTTTCGGGCACGGTGCATGCCGTGCGCGCAGTTTATC
F  H  R  Q  M  E  T  N  F  S  G  T  V  H  A  V  R  A  V  Y

      9430       9440       9450       9460       9470       9480
CGGACATGAAGAACAGGCCGCGGCATATTCTGATGGTTTCTTCGGGTGCCGGCCTGATCG
P  D  M  K  N  R  P  R  H  I  L  M  V  S  S  G  A  G  L  I

      9490       9500       9510       9520       9530       9540
GCATCTACGGATATACCGCCTACTGCGCCTCGAAGTTCGCGCTTAACGGCTTCGCCAGGC
G  I  Y  G  Y  T  A  Y  C  A  S  K  F  A  L  N  G  F  A  R
                     ribitol típusú alkohol-dehidrogenáz motívum

      9550       9560       9570       9580       9590       9600
GCTGCGCAGCGAACGCACGCCCACAATGTCGGCATTTCGATCTGCTTTCACCCGATACGG
R  C  A  A  N  A  R  P  Q  C  R  H  F  D  L  L  S  P  D  T

      9610       9620       9630       9640       9650       9660
AGACGCCGCAATTCAAGAGGGAGCTTGCCGCCCGGCCAGTGGAGGCAAGCGTAATCATGG
E  T  P  Q  F  K  R  E  L  A  A  R  P  V  E  A  S  V  I  M

      9670       9680       9690       9700       9710       9720
GAACCGTCCGCCCATGGACGGCCGAGGCGGTCGCGCGAAAGATCGTCAAGGGCATCGACC
G  T  V  R  P  W  T  A  E  A  V  A  R  K  I  V  K  G  I  D
```

```
      9730       9740       9750       9760       9770       9780
GGCGGCGCTTCGAGATTTATTTTGGCGCGGCCTTGTATCTTCTGCCGCTTCGGGCCGGCG
R  R  R  F  E  I  Y  F  G  A  A  L  Y  L  L  P  L  R  A  G

      9790       9800       9810       9820       9830       9840
GTCAGGCCTTTCCTCAATTGGTGGTTCGACCGGGCGATCGCGCGCAACAGTGGACTGTGA
G  Q  A  F  P  Q  L  V  V  R  P  G  D  R  A  Q  Q  W  T  V

      9850       9860       9870       9880       9890       9900
CGGCGGCGCCCGCGGCCATGCTTGTGCCAGCCAATATTAGGCTTTAAGTGTCGGGAGAAG
T  A  A  P  A  A  M  L  V  P  A  N  I  R  L  *

Tn5[608]
      9910       9920       9930       9940       9950       9960
CCTTCTGCCGAGGCGGCGACGGTGAAATGGCTCAAAGGTATCGGCTTGGCGCTCATTCCC
                        M  K  W  L  K  G  I  G  L  A  L  I  P
                    rkpI

      9970       9980       9990      10000      10010      10020
TTCAACCTGCATGACTACCCGATAGCCTTGACCCTCGGGTGCTACCTGCTGTCCTGCGCG
 F  N  L  H  D  Y  P  I  A  L  T  L  G  C  Y  L  L  S  C  A

     10030      10040      10050      10060      10070      10080
GTGATCTTCTATACGGACCGGTTCGCCCTTCCGGCGCGCGAACGCAGGAAGAACGCACCG
 V  I  F  Y  T  D  R  F  A  L  P  A  R  E  R  R  K  N  A  P

     10090      10100      10110      10120      10130      10140
AAATACGGGCGCAATCGGGACAGGATCGACCATCTCGCCCGGCTGCCGGTCATCGCGCTC
 K  Y  G  R  N  R  D  R  I  D  H  L  A  R  L  P  V  I  A  L
                        Tn5[551]
     10150      10160      10170      10180      10190      10200
GTCTTTGCCGGCTTCTTCGCGATCTCGTGGCGGCCCCTCTATGCCGCCGCCGGCACGATG
 V  F  A  G  F  F  A  I  S  W  R  P  L  Y  A  A  A  G  T  M

     10210      10220      10230      10240      10250      10260
AGTTTCTTCATCATTTTCACCGGCATTTCCCGCGCGAAGTTCAAGTTCATCCGTGAGCCG
 S  F  F  I  I  F  T  G  I  S  R  A  K  F  K  F  I  R  E  P

     10270      10280      10290      10300      10310      10320
CTGGTCTTTTCCGATATCGCCCTGGTCGCGGATGTCTTCAAGTACAAGACGATCTTCTAT
 L  V  F  S  D  I  A  L  V  A  D  V  F  K  Y  K  T  I  F  Y

     10330      10340      10350      10360      10370      10380
GCGAGTTCGCTGAACATCGTCTTCTGGATCGTCGCCTTCCTTTACGTGTTCGGCGTATCG
 A  S  S  L  N  I  V  F  W  I  V  A  F  L  Y  V  F  G  V  S

     10390      10400      10410      10420      10430      10440
GCACTTTACATGTATTTCGAGCCGACGATCCTGCCCGAAAGAAGCAGGCTCTTCTGGGTT
 A  L  Y  M  Y  F  E  P  T  I  L  P  E  R  S  R  L  F  W  V
```

```
     10450      10460      10470      10480      10490      10500
CTGGTGATGGTGGGGATCGCCGCCGGACCCTGGGGACTGTTGTTTTACGGGCCCGTGAAC
 L  V  M  V  G  I  A  A  G  P  W  G  L  L  F  Y  G  P  V  N

     10510      10520      10530      10540      10550      10560
CGCCCGACGGCCGCTCTCGTGCAGAGGCTGGTGAAGGCGATCAACGTCAAGATGAACACG
 R  P  T  A  A  L  V  Q  R  L  V  K  A  I  N  V  K  M  N  T

     10570      10580      10590      10600      10610      10620
GTGCGTTTCGGTACCTTCGCTTCCGTCGTCTTCCATTTCATCATCTGGCTCGGCGTCAAG
 V  R  F  G  T  F  A  S  V  V  F  H  F  I  I  W  L  G  V  K

     10630      10640      10650      10660      10670      10680
CGCGACAAGATCGTCGCCGAATTGTCGGAAATACTGCGCGCCGCGGTGCACGACCTCATC
 R  D  K  I  V  A  E  L  S  E  I  L  R  A  A  V  H  D  L  I

     10690      10700      10710      10720      10730      10740
GGCCACGAGGAGGCCCCGCTGATCATCGTATGGCAGTCGGAGTCCTTCATCGACATGCGG
 G  H  E  E  A  P  L  I  I  V  W  Q  S  E  S  F  I  D  M  R

     10750      10760      10770      10780      10790      10800
CATTTCGGTGTCGATTCGATCAAGCTTCCGACGGTCGACCGGTTGCGCAAGCAGGCGGTG
 H  F  G  V  D  S  I  K  L  P  T  V  D  R  L  R  K  Q  A  V

     10810      10820      10830      10840      10850      10860
CAATGGGGGCGCTTGAGCAATGTCTTCGAGGGCGGCTACACGCTGCGCACCGAATTTGCC
 Q  W  G  R  L  S  N  V  F  E  G  G  Y  T  L  R  T  E  F  A

     10870      10880      10890      10900      10910      10920
GTCCTGAGCGGCCTTGTGCCCGACGACATCCACGTCGATGCCAGCTATCCTTATCTCCGT
 V  L  S  G  L  V  P  D  D  I  H  V  D  A  S  Y  P  Y  L  R

     10930      10940      10950      10960      10970      10980
GCCGCGCACTATGCCGATATCGTCTGGCCCGGAAAGCTCAAGCGCGGCTGGCGCACGCAT
 A  A  H  Y  A  D  I  V  W  P  G  K  L  K  R  G  W  R  T  H

                                   Tn5[634]
     10990      11000      11010      11020      11030      11040
TTCATTCATCCCTATGACCGGACGTTCTTCCTGCGGCACAAGGCGATGCCCCTGCTCGGC
 F  I  H  P  Y  D  R  T  F  F  L  R  H  K  A  M  P  L  L  G

     11050      11060      11070      11080      11090      11100
TTCGAGAAGCTTACCATGCTCGATGCCTTCGACCATAAACCGGAGCGGGACGGGCTTTAT
 F  E  K  L  T  M  L  D  A  F  D  H  K  P  E  R  D  G  L  Y

     11110      11120      11130      11140      11150      11160
GTCTCCGACGCCACGCTGGCAGCCCGCGTGCTCGCCGAAGTCGAGAAGCTGCCGGAAGAG
 V  S  D  A  T  L  A  A  R  V  L  A  E  V  E  K  L  P  E  E
```

```
     11170      11180      11190      11200      11210      11220
GAGAGCGGCTTTTTCTTCGTCGCCTCGATGGCAAATCACGGCCCCTGGGAACCGGGGCGC
 E  S  G  F  F  F  V  A  S  M  A  N  H  G  P  W  E  P  G  R

     11230      11240      11250      11260      11270      11280
GTCGGTACGCTCACCAATCCCGTCGATATCTACCTGGCCATCCTCGAGCAGTCTGACGCT
 V  G  T  L  T  N  P  V  D  I  Y  L  A  I  L  E  Q  S  D  A

     11290      11300      11310      11320      11330      11340
GCGTTGAAGCAGCTGATCGACGGCCTCAACAAGCTCGACCGGCCGGTCTGGTTCGTCTTT
 A  L  K  Q  L  I  D  G  L  N  K  L  D  R  P  V  W  F  V  F

     11350      11360      11370      11380      11390      11400
TACGGCGACCACGCGCCCCTTCTGAAATCTTTCGCGGATCCCTTCCCGGATCCCCGCACG
 Y  G  D  H  A  P  L  L  K  S  F  A  D  P  F  P  D  P  R  T

     11410      11420      11430      11440      11450      11460
GATTATTTCATCGTGCCGCTCGCCAAGGCGCGCGCCGCGGCCCACAGCCCGAAGCGGCGG
 D  Y  F  I  V  P  L  A  K  A  R  A  A  A  H  S  P  K  R  R

     11470      11480      11490      11500      11510      11520
AAGGACGAGGATCCTTGGAACCTGCTCGGCTCCATGCTGAAGCACGCCAATCTGCACAAG
 K  D  E  D  P  W  N  L  L  G  S  M  L  K  H  A  N  L  H  K

     11530      11540      11550      11560      11570      11580
GACGCGCTGCAATAGCGCTGACTTCCGGAAATCCGCCCGATGACAGCAGTAACGACCATA
 D  A  L  Q  *                          M  T  A  V  T  T  I
                                        rkpJ

     11590      11600      11610      11620      11630      11640
GTACCCGCGCCGCCAAGAACCTTCCTGTTCTTGCAGGGACCGGCGTCGCGCGTCTTCGCC
 V  P  A  P  P  R  T  F  L  F  L  Q  G  P  A  S  R  V  F  A

     11650      11660      11670      11680      11690      11700
AAGGTCGCCGGGCATCTCGAAGTGCTGGGCCATTGCTGTCTGCGCATCAACCTCAATCCC
 K  V  A  G  H  L  E  V  L  G  H  C  C  L  R  I  N  L  N  P

     11710      11720      11730      11740      11750      11760
GGCGACCAGATATTCTGGCGGCGCCGGGCGGCCATAACTACCGTGGACTCGTTGGCGCGG
 G  D  Q  I  F  W  R  R  R  A  A  I  T  T  V  D  S  L  A  R

     11770      11780      11790      11800      11810      11820
TGGCCGGCCTATGTGGAGGCCTTTATCCGCCGCCACGCCGTCACCGACCTCGTCCTGCTC
 W  P  A  Y  V  E  A  F  I  R  R  H  A  V  T  D  L  V  L  L

     11830      11840      11850      11860      11870      11880
GGCGAAGAGCGCCCCTATCACCGGATCGCCACAGCGGCCGCGCGAAAAGCCGGCGTCCGC
 G  E  E  R  P  Y  H  R  I  A  T  A  A  A  R  K  A  G  V  R
```

```
     11890      11900      11910      11920      11930      11940
GTCTTTGTGGTCGAAATGGGCTATCTCAGGCCGGACTGGTTGACGCTCGAGCGCGGCGGC
 V  F  V  V  E  M  G  Y  L  R  P  D  W  L  T  L  E  R  G  G

     11950      11960      11970      11980      11990      12000
ATGTCGTCCAACTCGCACTTTCCGGTCGATCCCGCGCAAATCCTGCGAGCGGCAATGGGA
 M  S  S  N  S  H  F  P  V  D  P  A  Q  I  L  R  A  A  M  G
Tn5[633]

     12010      12020      12030      12040      12050      12060
CTGCCCGAGCCCGACTGGCAACGGCTCTACCGGCAGAGCTTTCTTGCGGAGGCGGCATAC
 L  P  E  P  D  W  Q  R  L  Y  R  Q  S  F  L  A  E  A  A  Y

     12070      12080      12090      12100      12110      12120
GACCTCCTCTACAACCTGCCGAACGTGTTTTTCTGCTTCCTCTTTCGCTACCCGCGGCAC
 D  L  L  Y  N  L  P  N  V  F  F  C  F  L  F  R  Y  P  R  H

     12130      12140      12150      12160      12170      12180
GGCATCTTTCATCCGCTCGCCGAATATGCCGGGTGGATCCGGATCCGGCGGCTGGCGGCC
 G  I  F  H  P  L  A  E  Y  A  G  W  I  R  I  R  R  L  A  A

     12190      12200      12210      12220      12230      12240
GGCAAACGCGAGCAGCGGCGCGCGGATGCGTTGATCCGCTCGCTTTCGGCGAAAAATGCG
 G  K  R  E  Q  R  R  A  D  A  L  I  R  S  L  S  A  K  N  A

     12250      12260      12270      12280      12290      12300
CCGTACTTCGTCTATCCGCTTCAACTTGAAACGGACTATCAATTGCGTGCGCATTCACCC
 P  Y  F  V  Y  P  L  Q  L  E  T  D  Y  Q  L  R  A  H  S  P

     12310      12320      12330      12340      12350      12360
TTCGGCAGCCAGCGGGAAGCGATCGACGGCATCCTTGCCTCTTTCGCGCACCGTGCGCCG
 F  G  S  Q  R  E  A  I  D  G  I  L  A  S  F  A  H  R  A  P

     12370      12380      12390      12400      12410      12420
GCAGGAACCAGGCTCGCCGTCAAGGTGCACCCGCTCGACAACAGCCTGATCTCCTGGCGC
 A  G  T  R  L  A  V  K  V  H  P  L  D  N  S  L  I  S  W  R

     12430      12440      12450      12460      12470      12480
AGGATCGTCGCGGACAAGGCCGCCTCACTCGGTGTCGGCGACAGGGTCCTCTATCTCGAC
 R  I  V  A  D  K  A  A  S  L  G  V  G  D  R  V  L  Y  L  D

     12490      12500      12510      12520      12530      12540
GGCGGCAATCTCGATTCGCTCACGGAGCACAGTTGCGGAATGGTAACGGTCAACTCGACC
 G  G  N  L  D  S  L  T  E  H  S  C  G  M  V  T  V  N  S  T

     12550      12560      12570      12580      12590      12600
GCCGGACTGCATGCTCTGAAGCAGGGCAAGCCCGTGAAGGTCCTGGGAAAGGCCGTCTTC
 A  G  L  H  A  L  K  Q  G  K  P  V  K  V  L  G  K  A  V  F
```

```
                                                    Tn5[671]
     12610      12620      12630      12640      12650 ↓    12660
GACATTGCCGGTCTCACCGACCAGCAGCCGCTCGACGCGTTCTGGACGGCGCCCGAGGCC
 D  I  A  G  L  T  D  Q  Q  P  L  D  A  F  W  T  A  P  E  A

     12670      12680      12690      12700      12710      12720
CCGGATCCGGTGCTGAGCGGGGCAATGTTCAGGCTGATGGCCGCTTCGATCCAGGTGCGC
 P  D  P  V  L  S  G  A  M  F  R  L  M  A  A  S  I  Q  V  R

     12730      12740      12750      12760      12770      12780
GGGAACTTCTATTCCGTGCGGGTACGGATGCCGGCCGCAAGGCCATCGCCGCAGGCTGCA
 G  N  F  Y  S  V  R  V  R  M  P  A  A  R  P  S  P  Q  A  A

     12790      12800      12810      12820      12830      12840
CCGCAACGACGTCAATGAACCGGGGCCCTTCGTCGACCCGCCGCCCCGGCCAAAAGCCGG
 P  Q  R  R  Q  *

     12850      12860      12870      12880      12890      12900
TGAAACTCAGCGAAGATCAGGCGACGCCGGCGCGCAGCAGATCGTGAATGTGCAGGATGC

     12910      12920      12930      12940      12950      12960
CGACCGGGGCGCCGGCCTCGTCGACGAGGAACAGCACGGTGGACCTTGTGGTCCTGCATG

     12970
AATTC
```

A négy ORF által meghatározott aminosav szekvenciákat számítógéppel analizáltuk. A vizsgálatok célja az volt, hogy egyrészt megállapítsuk a feltételezett fehérjék másodlagos szerkezetét (Argos és Rao, 1986) és hidrofobicitási tulajdonságaikat (Eisenberg és mtsai, 1986), másrészt irányadó információkat szerezzünk a fehérjék lehetséges funkciójáról. A gének által meghatározott aminosav-sorrendeket a Blast homológia kereső programcsomag segítségével (Altschul és mtsai, 1990) összehasonlítottuk adatbankokban tárolt fehérje szekvenciákkal. Olyan konzerválódott szekvencia motívumokat kerestünk, amelyek biokémiai funkciója már kísérletesen bizonyított (pl. szubsztrát kötőhelyek, aktív centrumok stb.), abból a célból, hogy ismert funkciójú fehérjékkel való hasonlóság esetén következtetni tudjunk az általunk analizált fehérjék biokémiai szerepére. Az ily módon nyert adatok természetesen nem szolgáltatnak abszolút bizonyítékot az általunk vizsgált fehérjék tulajdonságaival kapcsolatban, azonban sok esetben hasznos információt

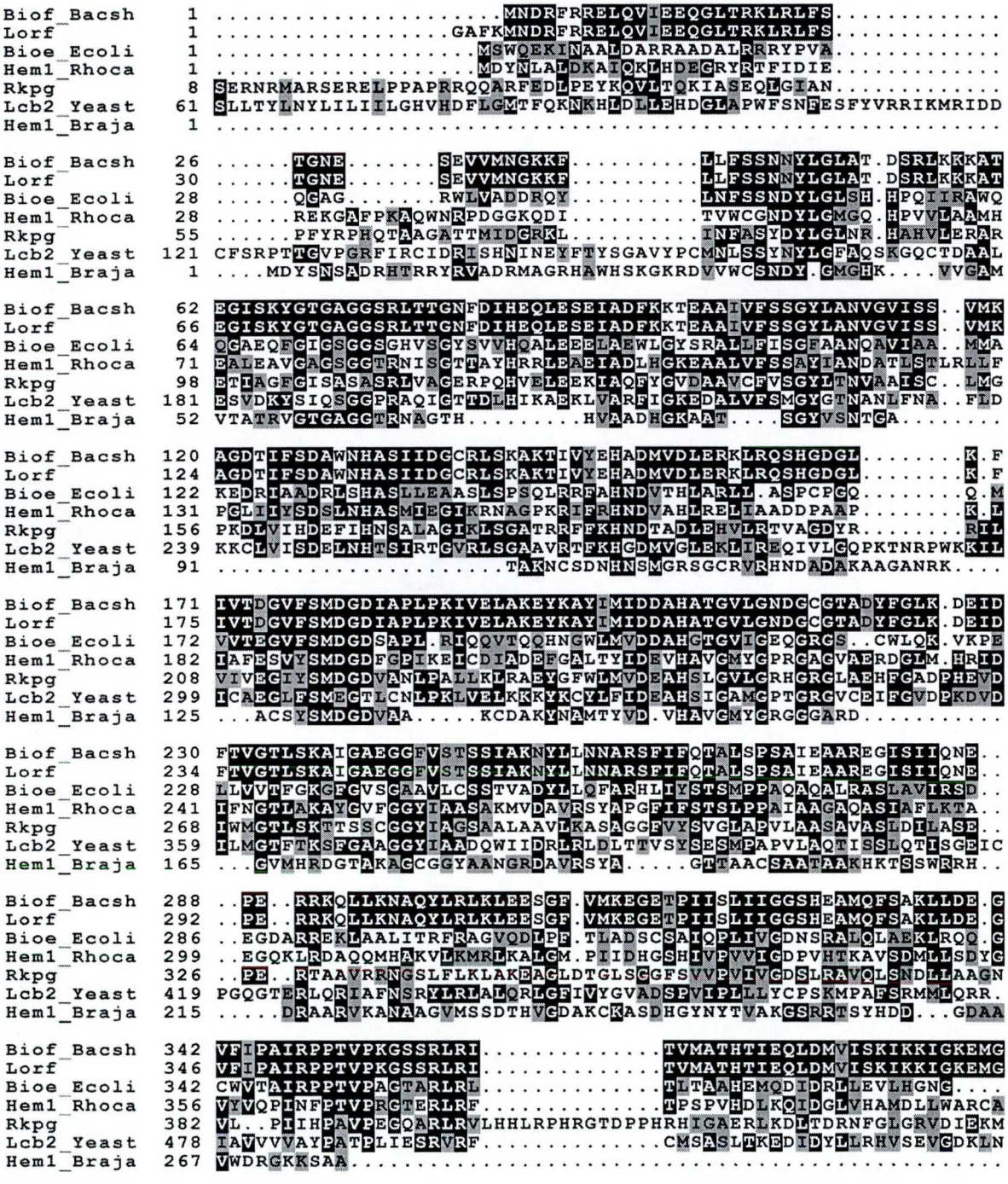
nyújtanak a további célirányos kísérletek tervezéséhez, amelyek segítségével a biokémiai funkció pontosan megállapítható.

4.1.1. Az *rkpG* analízise

Az első újonnan azonosított ORF három lehetséges, a 7599., a 7635. és a 7671. nukleotidnál található start kodonnal rendelkezik. A harmadik ATG kodon előtt 13 bp-nyira egy potenciális riboszóma-kötőhelyet azonosítottunk, aminek alapján úgy gondoljuk, hogy ez az ORF a 7671. nukleotidnál kezdődik és a 9011. nukleotidnál ér véget. Az így meghatározott *rkpG* gén 1341 nukleotid hosszú, melynek feltételezett fehérje terméke 446 aminosavat tartalmazó, 48,2 kDa molekulatömegű fehérje.

A peptidszekvencia számítógépes szerkezetanalízise öt hidrofób szakasz jelenlétét mutatta ki. Ezek közül két hidrofób domén elegendő hosszúságú ahhoz, hogy a sejtmembránt átívelje, és a fehérjét a membránhoz lehorgonyozza, a másik három feltehetőleg a belső membránhoz vagy más fehérjék hidrofób szakaszaihoz kapcsolódik apoláros-apoláros kölcsönhatás révén, avagy a molekula térszerkezetének kialakításában lehet szerepe.

Az RkpG adatbanki szekvenciákkal való összevetésével nagyfokú hasonlóságot mutattunk ki a kettes típusú acil-transzferázok közé tartozó enzimekkel (10. ábra). A homológiát mutató fehérjék mindegyike piridoxál-foszfát prosztetikus csoportot igényel a működéséhez. Feladatuk is nagyon hasonló, általában valamilyen acil csoportot kapcsolnak más vegyületekhez. A legnagyobb egyezést a filogenetikailag rokon *Bradyrhizobium japonicum*ból származó HemA proteinnel kaptunk. A két fehérje közötti aminosav azonosság 36%, a hasonló aminosavak aránya pedig 56%-nak adódott. Azonosítottunk egy, a piridoxál foszfát prosztetikus csoport kötéséért felelős szekvencia motívumot (GTLSKTTSS), amely erős konzerválódást mutatott minden vizsgált fehérje esetében.

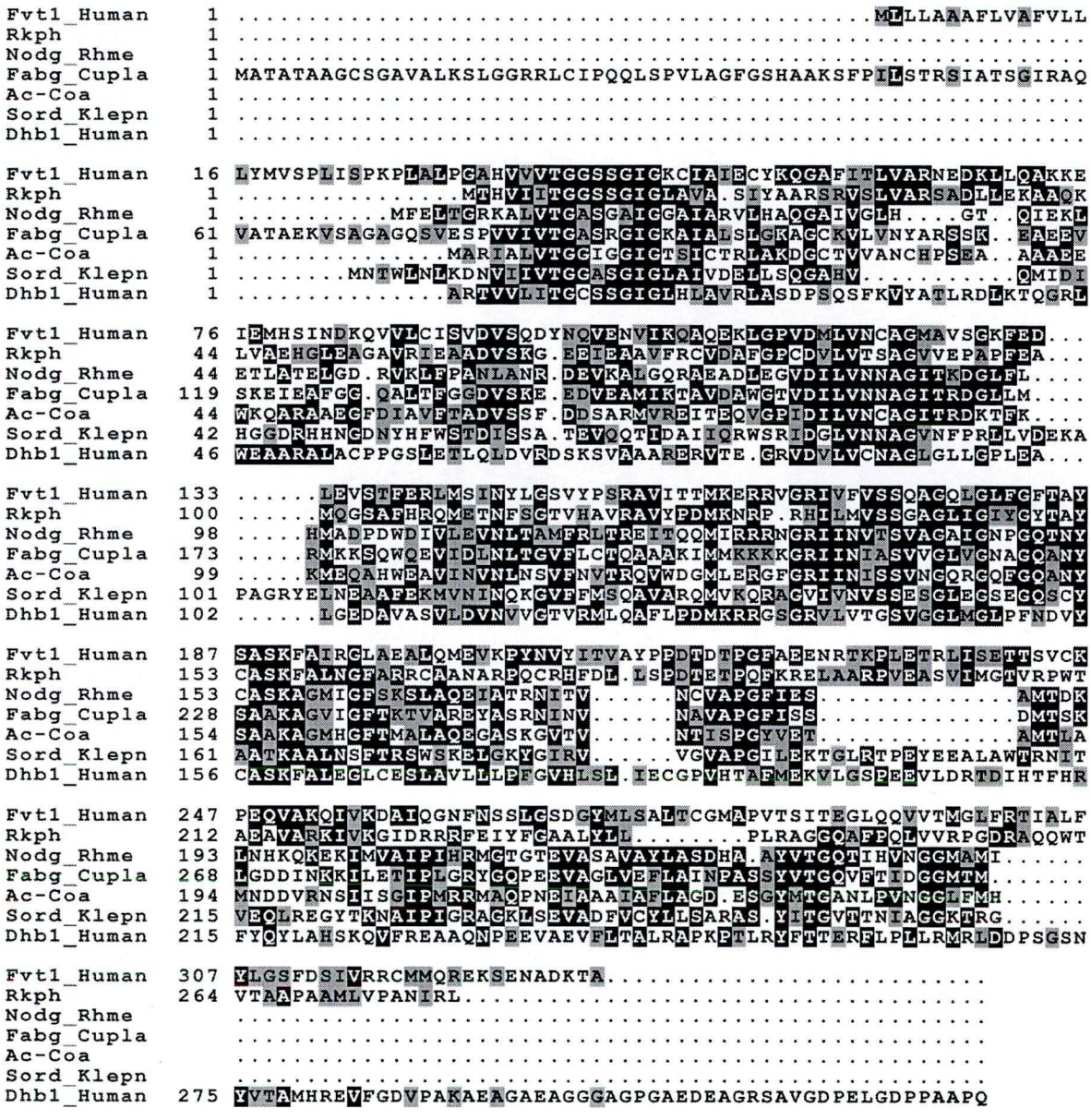


10. ábra. Az RkpG protein illesztése a II. típusú piridoxál foszfát függő acil-transzferáz családba tartozó enzimekkel. Biof_Bacsh=8-amino-7-oxonanoate szintáz, *Bacillus sphaericus* (sp:P22806); Lorf=eddig nem jellemzett szekvencia (gp:A02597), Bioe_Ecoli=BioE, *E. coli* (gp:A11542); Hem1_Rhoca=5-aminolevulinsav szintáz, *Rhodobacter capsulatus* (sp:P18079); Lcb2_Yeast=serine-palmitoil transzferáz 2, *Saccharomyces cerevisiae* (sp:P40970); Hem1_Braja=5-aminolevulinsav szintáz, *Bradyrhizobium japonicum* (sp:P08262). A fenti szekvenciák hivatkozási számai zárójelben találhatóak: sp=SWISS-PROT Protein Sequence Database, gp=GenPept Protein Sequence Database. A *fix-23* régió teljes nukleotid szekvenciája az EMBL adatbankban található, az X64131 hivatkozási szám alatt. A fekete alapon fehér betűk aminosav egyezést, a szürke alapon fehérek aminosav hasonlóságot jelölnek.

4.1.2. Az *rkpH* analízise

A 840 bp hosszúságú (9048-tól a 9887. nukleotidig) *rkpH* gén egy 279 aminosavból álló polipeptidet kódol, melynek számított molekulatömege 29,7 kDa. Az iniciációs kodon előtt nem találtunk jellegzetes riboszóma-kötő helyet. Az *rkpH*-ról átírt aminosav szekvencia szerkezetének vizsgálata három erősen hidrofób részt tárt fel, amelyek flexibilis hidrofil szakaszokkal váltakozva helyezkednek el.

Fehérje adatbankokkal való összevetés során nagyfokú homológiát kaptunk az RkpH és a ribitol, vagy más néven rövid lánchosszúságú alkohol-dehidrogenázok enzim-családjának számos tagjával. Ezek az enzimek általában szerves molekulák redukciójában vesznek részt. A legnagyobb hasonlóságot (32% a.s. azonosság, 54% hasonlóság) az FVT-1 nevű humán génnel kaptuk, ami follikuláris sejtek elrákosodásában játszik szerepet (Rimokh és mtsai, 1993). A homológok között található még a *R. meliloti* NodG fehérjéje is, ami a Nod-szignál zsírsav részének szintézisében vesz részt. Ezek az enzimek működésükhöz NADH-t vagy NADPH-t igényelnek, melynek kötőhelye (TGGSSGIG) az egész enzim-családban konzerválódott (Jörnvall és mtsai, 1984), és a fehérje N-terminálisának közvetlen közelében helyezkedik el. A polipeptid közepén egy másik konzerválódott szekvencia motívum (YCASKFALNGF) található, amely az enzim aktív centrumának a kialakításáért felelős (Persson és mtsai, 1991). Az RkpH peptidszekvenciában a megfelelő pozícióban mindkét motívum megtalálható. Érdekes módon mindkét konzerválódott szekvencia egybeesett egy-egy hidrofób, a számítógépes predikció alapján membrán-kötött régióval.



11. ábra Az RkpH protein összehasonlítása ribitol-típusú dehidrogenázokkal. Fvt1_Human=Follikuláris Variációt okozó Transzlokációs Protein 1 prekurzor (sp:Q06136); Nodg_Rhme=NodG, *R. meliloti* (gp:Y00604); Fabg_Cupla=3-ketoacil-acil carrier protein reductase, *Cuphea lanceolata* (sp:P28643); Ac-CoA=acetoacetyl-CoA reduktáz, *Chromatium vinosum* (PIR:S29279); Sord_Klepn=Szorbitol-6 foszfát 2-dehidrogenáz, *Klebsiella pneumoniae* (sp:P37079); Dhb1_Human= 17-béta -hidroxiszteroid dehidrogenáz (sp:P14061).

Az *rkpI* analízise

A harmadik komplementációs csoport nukleotid sorrendjének kodon-preferencia analízise egyetlen nagy ORF létét valószínűsítette. A program által megadott leolvasási keretben nem találtunk megfelelő pozíciójú ATG start kodont, ezért a géntermék számítógépes analízise alapján úgy gondoljuk, hogy ez az ORF a 9922. nukleotidnál levő GTG kodonnal kezdődik, és a 11535. bp-ig tart. Így az *rkpI* gén egy 445 aminosav hosszúságú, 61,1 kDa molekulatömegű polipeptidet kódol. A feltételezett GTG start kodontól 12 bp-nyira 5`irányban egy potenciális riboszóma-kötő helyet azonosítottunk. Az aminosav szekvencia topológiai vizsgálata 6 membrán átívelő domént jelzett a polipeptid első felén, amelyek nagy valószínűséggel a fehérjét a membránhoz rögzítik. Az *rkpI* által kódolt peptid szekvenciát adatbázisokkal összehasonlítva sem konzerválódott régiót, sem homológ gént nem találtunk.

4.1.4. Az *rkpJ* analízise

A negyedik komplementációs csoportban szintén egy potenciális kódoló ORF-et azonosítottunk a 11560. nukleotidtól a 12798-ig. Az ATG start kodon előtt 8 bp-ra egy lehetséges riboszóma-kötőhelyet találtunk, amely azt sugallja, hogy az *rkpJ* gén egy külön, a többi ORF-től független átíródási egységet alkot. Az *rkpJ* egy 412 aminosavból álló, 45,8 kDa molekulatömegű polipeptidet határoz meg. Az RkpJ hidrofil tulajdonságú, nem tartalmaz membrán átívelő szakaszokat és membránhoz asszociált hélixeket sem, nagy valószínűség szerint a citoplazmában található fehérje. Adatbanki szekvenciákkal összevetve hasonlóságot (32% a.s. azonosság, 55% hasonlóság) fedeztünk fel az *E. coli* KpS (Pazzani és mtsai, 1993), és a *N. meningitidis* LipB fehérjéjével (Frosch és mtsai, 1993). Ez a két fehérje azonos funkciójú, mindkettő a baktérium kapszuláris poliszacharidjának szintézisében és transzportjában vesz részt. Mutációjuk esetén a KPS-hez nem kapcsolódik lipid, és nem jut ki a sejt felszínére, hanem a sejt citoplazmájában halmozódik fel.

```
Lipb      1 MKQTVLKNNLQNLLESAENILLLQGPVGDFFLRLADWLTANGKTVHKFNFNAGDDYFYPP
Kss5      1 .....MQGNALTVLLSGKKYLLLQGPMGPFFSDVAEWLESLGRNAVNVVFNGGDRFYCRH
Rkpj      1 .....MTAVTTIVPAPPRTFLFLQGPASRVFAKVAGHLEVLGHCCLRINLNPGDQIFWRR

Lipb     61 TQAHTVVFNDNYDAFPEFLQEYITQHHIQAVVCFGDTRPYHVIAKRIANENQASFWAFEE
Kss5     56 RQ..YLAYYQTPKEFPGWLRDLHRQYDFDTILCFGDCRPLHKEAKRWAKAKGIRELAFEE
Rkpj     56 RAAITTV..DSLARWPAYVEAFIRRHAVTDLVLLGEERPYHRIATAAARKAGVRVFVVEM

Lipb    121 GYFRPYYITLEKDGVNAFSPLPRR.ADFF..LEQFPKLA.QQEYKAPTPVHGGFTPMAKN
Kss5    114 GYLRPQFITVEEGGVNAYSSLPRD.PDFYRKLPDMPTPH.VENLKPSTMKRIG.....H
Rkpj    114 GYLRPDWLTLERGGMSSNSHFPVDPAQILRAAMGLPEPDWQRLYRQSFLAEAAYDLLYNL

Lipb    177 AIRYYIELFRNPR........KYPDYIHHRAPNAGHYLKPWSLSILKRLNYYIEDIQIAK
Kss5    166 AMWYYLMGWHYRH........EFPRYRHHKSFSPWYEARCWVRAYWRKQLYKVTQRKVLP
Rkpj    174 PNVFFCFLFRYPRHGIFHPLAEYAGWIRIRRLAAGKREQRRADALIRSL..........

Lipb    229 RVEAGKYGKFFIVPLQVFNDSQVRIHCDFPSVRSFLLHVLSSFAEHAPADTNIIIKHHPM
Kss5    218 RLMNELDQRYYLAVLQVYNDSQIRNHSSYNDVRDYINEVMYSFSRKAPKESYLVIKHHPM
Rkpj    223 ...SAKNAPYFVYPLQLETDYQLRAHSPFGSQREAIDGILASFAHRAPAGTRLAVKVHPL

Lipb    289 DRGFIDYWRDIKRFIKEHPELKGRVIYVHDVPLPVFLRHGLGMVTINSTSGLSGLIHNMP
Kss5    278 DRGHRLYRPLIKRLSKEY.GLGERILYVHDLPMPELLRHAKAVVTINSTAGISALIHNKP
Rkpj    280 DNSLISWRRIVADKAASL.GVGDRVLYLDGGNLDSLTEHSCGMVTVNSTAGLHALKQGKP

Lipb    349 VKVLGRAYYDIPGITDQNTLAEFWNHPTPPDKELFHAYRMYHLNVTQINGNFYS.QVFFP
Kss5    337 LKVMGNALYDIKGLTYQGHLHQFWQADFKPDMKLFKKFRGYLLVKTQVNAVYY.......
Rkpj    339 VKVLGKAVFDIAGLTDQQPLDAFWTAPEAPDPVLSGAMFRLMAASIQVRGNFYSVRVRMP

Lipb    408 NKNTSDSSTPTT..
Kss5        ..............
Rkpj    399 AARPSPQAAPQRRQ
```

12. ábra Az RkpJ illesztése KPS transzportban résztvevő enzimekkel. Kss5=KpsS, *E. coli* (sp:P42218); Lipb=LipB, *Neisseria meningitidis* (sp:Q05014).

4.2. A *fix-23* mutánsok által termelt KPS vizsgálata

A *fix-23* régió vizsgálatának egy másik lehetséges útja a régióba térképeződő mutánsok által termelt KPS szerkezetének biokémiai analízise volt. Reméltük, hogy a mutáns és a vad típusú *Rhizobiumok* poliszacharidjainak összehasonlítása információt nyújt a mutációk által inaktivált gének szerepére vonatkozóan. Ezeket a vizsgálatokat R. W. Carlson és munkacsoportjával (Complex Carbohydrate Research Center Athens, Georgia, USA) való kooperációnk keretében J. Kim és B. Reuhs végezték el.

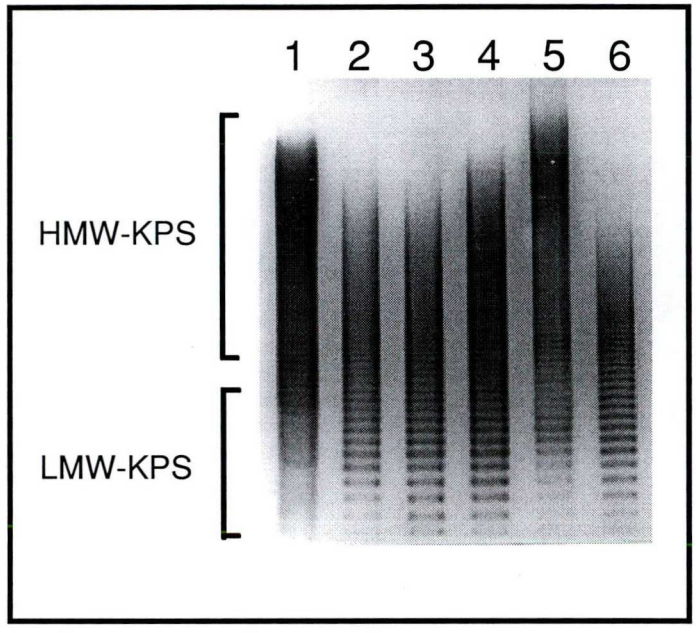
4.2.1. A poliszacharidok PAGE analízise

A *fix-23* régió első komplementációs csoportjába térképeződő mutánsok által termelt poliszacharidokat Petrovics György és a fent említett amerikai kollégák (1993) analizálták. Kimutatták, hogy a mutációk következtében a baktériumok rezisztensek lettek a 16-3 fággal szemben, mivel a mutáns baktériumok felületéről hiányzik a bakteriofág receptoraként szolgáló nagy molekulatömegű kapszuláris poliszacharid.

A jelen vizsgálatunk tárgyát képező további három komplementációs csoportba tartozó mutánsok kettő kivételével szintén rezisztensnek bizonyultak a 16-3 fággal szemben. A PP608 és a PP618 törzsek átmeneti, kissé szenzitív fenotípust mutattak. Ezért feltételeztük, hogy a fágrezisztens mutánsok a már analizáltakhoz hasonlóan képtelenek a fág tapadási helyéül szolgáló KPS termelésére, vagy pedig olyan eltérő szerkezetű poliszacharidokat termelnek, amelyeken a fágok már képtelenek megtapadni.

A kérdés eldöntésére a mutáns és a vad típusú baktériumokból poliszacharid izolátumokat készítettünk, amelyeket poliakrilamid géleken futtattunk meg (13. ábra). Az általunk használt forró fenolos extrakcióval a KPS és LPS molekulák elegyét kaptuk. A zavaró LPS mintázat kiküszöbölésére KPS specifikus festési eljárást használtunk. A géleket először Alcian kékkel kezeltük. Ez egy kationos festék, ami a savas poliszacharidokhoz kötődik. Ezután ezüst festést alkalmaztunk. Ily módon csak a KPS molekulák festődtek meg. Mivel minden egyes megfuttatott minta azonos mennyiségű

kiindulási baktériumból származott, a PAGE gélen látható eltérő festődési intenzitás arányban áll az egyes baktérium törzsek eltérő KPS termelésével. A KPS termelés szempontjából vad típusú AK631 (1. minta) nagy mennyiségű poliszacharidot termel. Különösen erős a festődés a nagy molekulatömegű HMW-KPS tartományában. A mintákban a HMW-KPS alatt látható létraszerű mintázat a poliszacharid molekulák eltérő polimerizációs foka miatt alakul ki.



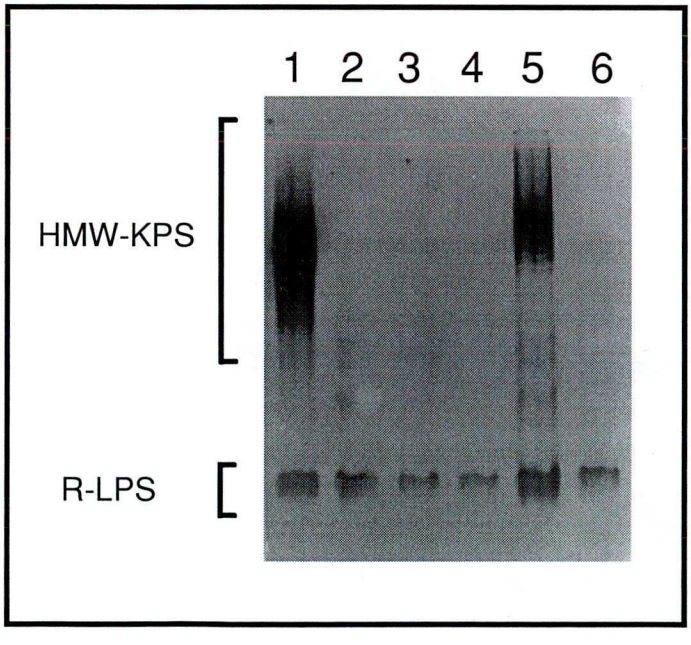
13. ábra. KPS izolátumok PAGE analízise. A gélre felvitt minták sorrendje: AK631 (1); PP590 (2); PP551 (3); PP608 (4); PP618 (5); PP671 (6).

Az *rkpH* génben mutáns (PP618), valamint az *rkpI* gén promóter régiójába eső PP608 több HMW-KPS-t termel (4.és 5. minta), mint az *rkpG*, *rkpI* és az *rkpJ* gén mutánsai (2., 3., 6. minta), de jóval kevesebbet, mint az AK631. A gélen az is jól látható, hogy a különböző polimerizációs fokú KPS-ek aránya az egyes mintákban eltérő. A vad típusú baktériumból származó mintában a HMW-KPS dominál, az alacsony polimerizációs fokú termékek aránya kicsi. Ugyanez mondható el a PP618-ról is, sőt ez a mutáns magasabb polimerizációs fokú KPS-t is termel, mint a vad, amit a kisebb mobilitású, tehát nagyobb molekulatömegű KPS megjelenése bizonyít az 5. minta tetején. A PP608 jóval kevesebb HMW-KPS-t termel, és a legnagyobb mennyiségben jelenlevő poliszacharid

polimerizációs foka is alacsonyabb, mint a PP618-ban. A másik három vizsgált mutánsban, az első komplementációs csoport mutánsaihoz hasonlóan, hiányzik a vad típusra jellemző HMW-KPS, viszont a kis polimerizációs fokú KPS aránya magasabb, mint a vadban. A PAGE analízis eredményei egybevágnak a fágtapadási tesztek adataival, miszerint a PP590, PP551, PP671 mutánsok a HMW-KPS hiányában fág rezisztensek lettek, míg a mutánsok közül a legtöbb HMW-KPS-t termelő PP618 jobban, a kevesebb és alacsonyabb molekulatömegű KPS-t előállító PP608 kevésbé őrizte meg a vad típusú baktériumra jellemző szenzitivitását a 16-3 fággal szemben.

4.2.2. A poliszacharidok immunkémiai analízise

Az első komplementációs csoportba tartozó mutánsok immunkémiai vizsgálataiból (Petrovics és mtsai, 1993; Reuhs és mtsai, 1993) kiderült, hogy ezek a törzsek csak igen kis mennyiségű LMW-KPS termelésére képesek, viszont ezek a mutációk nem befolyásolják az LPS mintázatot.



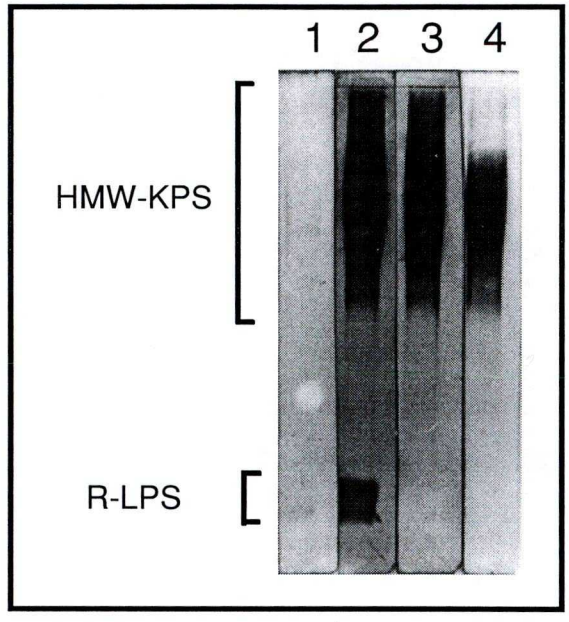
14. ábra. KPS izolátumok immunkémiai analízise. A minták sorrendje megegyezik az előző ábráéval. A nagy mólsúlyú (HMW) KPS valamint a durva (R) LPS festődési helyét jeleztük.

Az előző alfejezetben tárgyalt baktérium törzsek által termelt poliszacharidok vizsgálatát a vad típusú *R. meliloti* 41 törzs sejtfelszíne ellen indukált poliklonális ellenanyag segítségével végeztük el. A PAGE géleken megfuttatott poliszacharid mintákat Nytran membránra vittük át, majd a membránokat kezeletlen (14. ábra), vagy különböző baktérium sejtekkel preadszorbeáltatott (15. ábra) anti-Rm41 ellenanyaggal festettük meg.

Az AK631 és a PP618 törzsből származó HMW-KPS (14. ábra, 1. és 5. oszlop) erősen kötötte az ellenanyagot. Igen halvány, a fényképen már ki sem vehető festődést tapasztaltunk a PP608-ból származó mintában (4.), míg a többi minta egyáltalán nem festődött. Érdekes módon az alacsonyabb polimerizációs fokú LMW-KPS egyetlen mintában sem festődött jól, annak ellenére, hogy a HMW- és LMW-KPS szerkezete és összetétele szinte teljesen azonos, vagy csak igen kis mértekben különbözik (Reuhs és mtsai, 1995). A jelenség egyik lehetséges magyarázata az, hogy a kisebb tagszámú LMW polimer kevesebb epitopot szolgáltat az ellenanyag számára. Az is elképzelhető, hogy az LMW-KPS transzfere a gélből kevésbé hatásos, vagy az kevésbé kötődik a membránhoz.

A fenti kísérletekben poliszacharid kivonatokat használtunk, azaz a minták egyaránt tartalmazták a sejtek belsejéből valamint a sejtek külső felületéről származó molekulákat. Az anti-Rm41 ellenanyag a vad típusú baktérium sejtfelszíne ellen készült, tehát csak az ott prezentált, vagy azokkal azonos szerkezetű molekulákat ismeri fel. A további kísérletekben az ellenanyagot különböző baktérium sejtekkel előinkubálva ebből az ellenanyag keverékből kivontuk az adott baktérium sejtfelszínére specifikus antitesteket. Az ily módon előkezelt ellenanyag mintában maradt antitesteket AK631-ből származó poliszacharid kivonat segítségével teszteltük (15. ábra). Pozitív kontrolként magát az AK631 baktériumot használtuk (1. minta), ami a szérumban található összes ellenanyagot kikötötte a preadszorpció során, ezért az immunoblotton már nem kaptunk festődést. A második immunfestés (negatív kontrol) a kezeletlen ellenanyag felhasználásával készült. Ennek következtében az immunoblotton a vad típusú extraktumra jellemző teljes festődési mintázat (ld. előző ábra) látható. A harmadik szérum mintát PP674-el (*rkpA::Tn5*)

kezeltük, amely kikötötte az összes LPS és LMW-KPS antitestet, csak a HMW-KPS specifikus antitesteket hagyva hátra.

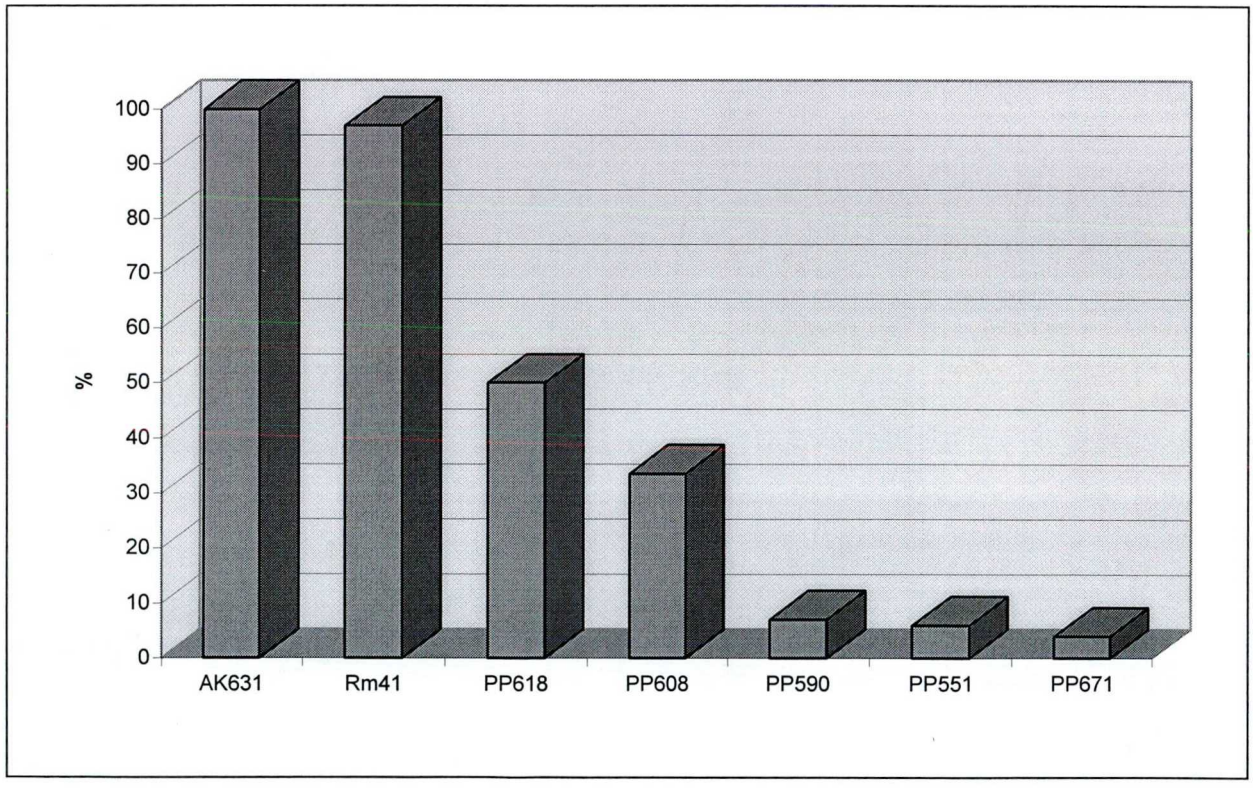


15. ábra. AK631-ből származó KPS izolátumok festése előzőleg különböző baktérium tenyészetekkel kezelt ellenanyaggal. AK631(1), baktérium nélkül (2), PP674(3), PP618(4).

A HMW-KPS festődési intenzitása nagyjából megegyezett a negatív kontrolléval, ami megerősítette a korábbi eredményeket, melyek szerint az eddig vizsgált *fix-23* mutánsok nem termelnek, vagy a sejtfelszínükre nem exportálnak jelentős mennyiségű HMW-KPS-t. Az LPS specifikus antitestek teljes kikötése azt jelzi, hogy a *fix-23* mutációk nem befolyásolják az LPS szerkezetét. A negyedik szérum mintát az *rkpH* mutáns PP618-al kezeltük, ami a HMW-KPS specifikus antitestek egy részét is eltávolította, amit az immunoblotton látható gyengébb festődés jelez. Ez arra enged következtetni, hogy a PP618 sejfelszínén korlátozott mennyiségű, de a vad típusúval szerkezetileg megegyező HMW-KPS található. A többi mutánssal való előinkubáció a PP674-el megegyező festődést eredményezett (ezeket külön nem mutatjuk be), jelezvén a HMW-KPS hiányát a baktériumok felszínén.

4.2.3. A poliszacharidok ELIZA analízise

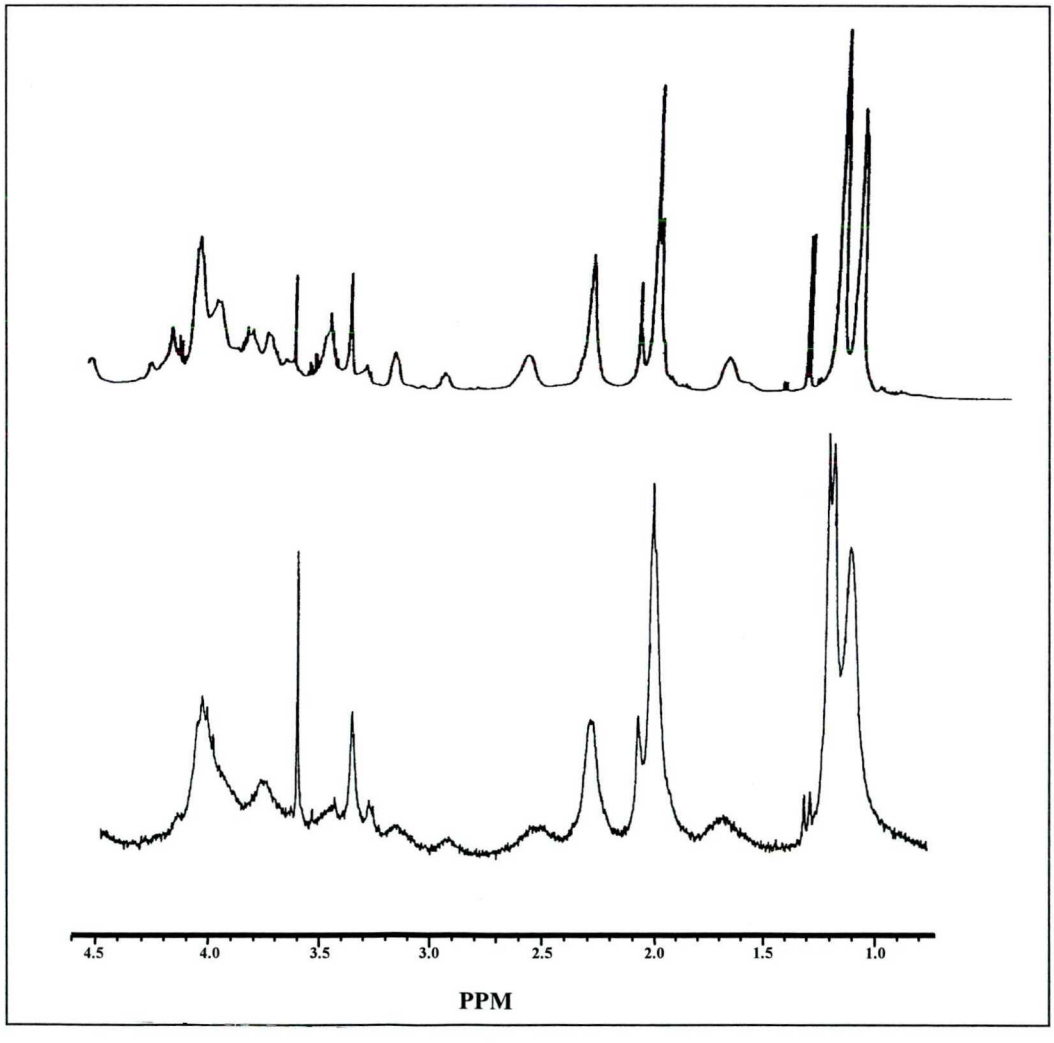
A különböző mutáns baktériumok sejtfelszínén található KPS egymáshoz viszonyított mennyiségének meghatározására ELIZA tesztet alkalmaztunk (16. ábra). A kísérletekhez olyan anti-Rm41 szérumot használtunk, amelyet előzőleg PP674 baktériumokkal preadszorbeáltatva HMW-KPS specifikussá tettünk. A vad típusú *R. meliloti* 41 és AK631 megközelítőleg azonos választ adott, jelezve, hogy e két baktériumnak közel azonos mennyiségű KPS található a felületén. Ezt a KPS mennyiséget 100%-nak véve a fág szenzitív mutánsok esetében a következő relatív értékeket kaptuk: PP618, 50%; PP608, 33,5%. A fág rezisztens mutánsok esetében (PP590, PP551, PP671) ez az érték 4-7% között volt.



16. ábra. A mutáns baktériumok ELIZA eredményei a vad típusú AK631 által adott érték függvényében. Az itt megadott százalékos értékek 6 független ELIZA mérés (OD_{492}) eredményének átlagolásából származnak. Az ábrázolt értékek átlagtól való eltérése minden esetben kevesebb, mint 2% volt.

4.2.4. NMR analízis

A PP618-as mutánsból származó tisztított KPS NMR spektrumát összehasonlítottuk az AK631 baktériumból izolált KPS-ével (17. ábra). Megállapítottuk, hogy a KPS főbb alkotóelemeit jelentő acetátot (2,0 és 2,1 PPM), β-hidroxi-butirátot (1,2 és 2,35 PPM), valamint 2-keto-3,5,7,9-tetradeoxi-5,7-diaminononulonsavat (1,1; 1,7; 2,6; 4,0 PPM) reprezentáló rezonancia görbék a PP618-as mutáns és a vad típusú baktérium esetében azonosak, amiből arra lehet következtetni, hogy a PP618 a vad típussal megegyező szerkezetű KPS-t termel. Az *rkpH* tehát inkább a KPS exportjában, mintsem a szintézisében játszik szerepet, hiszen mutációja nem érinti a termelődő KPS szerkezetét, csupán a sejfelszínen való mennyiségét.



17. ábra. Az AK631 (felül) és a PP618 (alul) baktériumokból izolált KPS ^{1}H NMR spektruma.

4.3. A *R. meliloti* kapszuláris poliszacharid szintézisében résztvevő további géncsoportok azonosítása és analízise

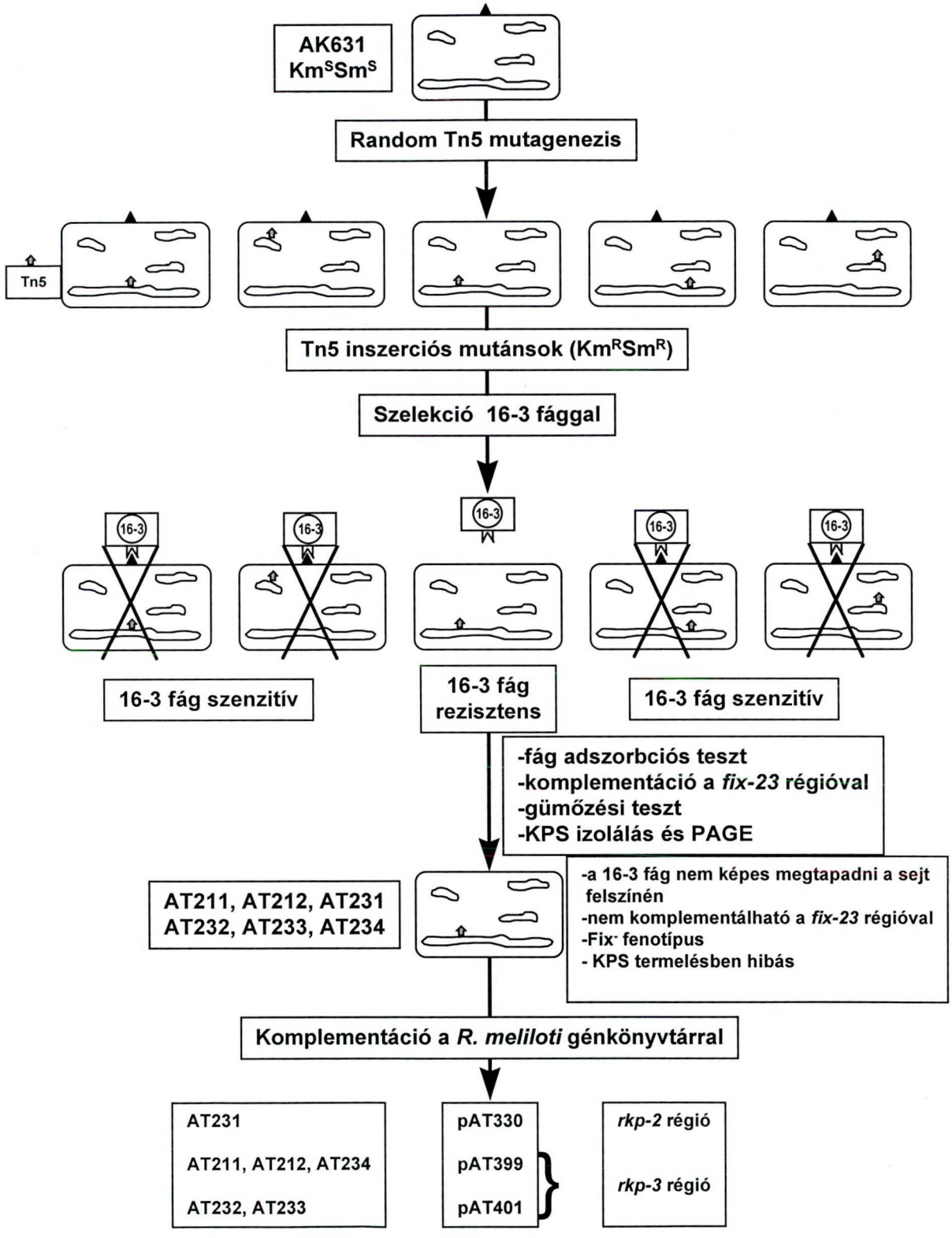
Az eddig tárgyalt kísérleteinkben a *fix-23* régió jobb oldalán elhelyezkedő három komplementációs egységet vizsgáltunk, melyekben négy gént azonosítottunk: az *rkpGHI* és *rkpJ* géneket. Eredményeink szerint a *fix-23* régióban található összes gén, beleértve a korábban azonosított *rkpABCDEF* géneket, esszenciális szerepet játszik a *R. meliloti* KPS-ének szintézisében és/vagy sejtfelszínre való transzportjában. A régió által kódolt fehérjéknek a homológiák alapján feltételezett funkciója azonban inkább a KPS lipid részének felépítése, módosítása, és a komplett poliszacharid sejtfelszínre juttatása, mintsem a poliszacharid prekurzoroknak a szintézise. Ezek alapján feltételeztük, hogy a *fix-23* régión kívül még további gének játszanak szerepet a KPS poliszacharid vázának a szintézisében.

A továbbiakban azonosított *rkp* régiók izolálását Kereszt Attila, az új *rkp* mutánsok által termelt poliszacharidok analízisét pedig Putnoky Péter végezte. A mutációkat komplementáló DNS szakaszok szubklónozása, szekvenciájának meghatározása és analízise a *fix-23* régiónál már ismertetett módon történt. A dolgozat limitált terjedelme sajnos nem teszi lehetővé, hogy a fent említett kísérleteket teljes terjedelmében ismertessem.

Eredményeink szerint a KPS termelésében hibás *R. meliloti* baktériumok rezisztensek a 16-3 fággal szemben. Éppen ezért, a fág alkalmas eszköznek tűnt új szerkezeti mutánsok azonosítására (18. ábra). A baktérium random Tn*5* transzpozíciós mutagenezise után kiválogattuk a 16-3 fágra rezisztens mutánsokat és fágtapadási vizsgálatok, genetikai komplementációs kísérletek, valamint növényi tesztek segítségével jellemeztük őket.

Kiválogattuk a mutánsok közül azokat, melyek felületére nem kötődött ki a 16-3 fág, jelezve, hogy a kialakult fágrezisztencia felszíni változás eredménye. Az így elkülönített mutációkat tovább osztályoztuk genetikai komplementációs kísérletekben. Megvizsgáltuk, melyeket nem lehet komplementálni a korábbi munkánk során azonosított *fix-23* régióval.

Feltételeztük, hogy a nem komplementálható mutációk segítségével izolálni tudjuk a még ismeretlen bioszintézis géneket.



18. ábra. Az *rkp-2* és *rkp-3* régiók izolálásának stratégiája. A lekerekített téglalapokkal szimbolizált baktériumokon található kis fekete háromszögek a 16-3 fág tapadási helyét jelölik. A téglalapok belsejében látható nagyobb szabálytalan görbe vonal a *Rhizobium* kromoszómáját, a három kisebb görbe pedig 2 megaplazmidját és egy kisebb plazmidját jelölik. A λ::Tn5 beépülési helyeit felfelé mutató fekete nyilak mutatják.

Hat független mutánst sikerült a fentiekben leírt módon azonosítanunk. Ezek hibásak voltak a szimbiózis kialakításában (Fix^- fenotípus), valamint a fágrezisztens fenotípusuk és PAGE analízisük alapján ezek a mutánsok mind sérültek a KPS termelésben is.

Az új mutánsok segítségével egy *R. meliloti* génbankból izoláltuk a mutációkat komplementáló DNS szakaszokat. Kiválogattuk azokat a génbank klónokat hordozó baktériumokat, melyek a lucernával működő szimbiózist tudtak létrehozni (Fix^+ fenotípus). E kozmid klónok visszaizolálásával és a mutánsokba való újbóli bejuttatásával igazoltuk, hogy valóban a mutációkat komplementáló DNS szakaszok vannak a kezünkben. Ily módon egy különálló (*rkp-2* régió) és két, egymással átfedő (*rkp-3* régió) kozmid klónt azonosítottunk. (A *R. meliloti* KPS szintézisben résztvevő gének illetve géncsoportok egységes elnevezése érdekében a *fix-23* régiót *rkp-1* régiónak neveztük át.)

Az új régiók helyspecifikus transzpozíciós mutagenezisével meghatároztuk a KPS szintézisben szerepet játszó gének elhelyezkedését, és elkezdtük bázissorrendjük meghatározását.

4.3.1. Az *rkp-2* régió analízise

Az *rkp-2* régió helyspecifikus λ::Tn5 mutagenezisét a pAT330 kozmid klónon hajtottuk végre. A Tn5 inszerciók *Rhizobium* genomba való juttatásával kapott homogenóták egy része sokkal lassabban nőtt és kisebb telepet képzett a megszokottnál. Egyes LPS mutánsok esetében hasonló fenotípust tapasztaltak (Lagares és mtsai, 1992), ezért megvizsgáltuk az általunk izolált mutánsok LPS termelését. Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy az LPS mutánsok érzékenyek a detergensekre, mivel membránjuk kevésbé ellenálló a hidrofób molekulákkal szemben (Lagares és mtsai, 1992). Mutánsaink detergensekkel szembeni érzékenységét deoxy-kólsav (DOC) tartalmú táptalajon való növesztéssel ellenőriztük. A vad típusú AK631 növekedésére a DOC nem volt hatással, a mutánsok azonban 10^4-10^5-szer kevesebb kolóniát képeztek az 1 mg/ml detergens tartalmú táptalajon, valószínűsítve, hogy a mutációk LPS termelésben résztvevő géneket érintenek.

A mutánsok által termelt poliszacharidokat az *rkp-1* régió analízise során már ismertetett forró fenolos módszerrel izoláltuk, amely a KPS és LPS molekulák együttes tisztítását tette lehetővé (Reuhs és mtsai, 1993). Az izolátumokat párhuzamosan két PAGE gélen futtattuk meg. Ezek egyikét ezüsttel festettük meg (Tschai és Frisch, 1982), ami az LPS mintázat vizsgálatát tette lehetővé. A másik gélt Alcián kékkel kezeltük, ami pedig csak a KPS specifikus csíkokat tette láthatóvá (Reuhs és mtsai, 1993).

Megállapítottuk, hogy a mutánsok LPS mintázata különbözik a vad típustól, ez alátámasztja azt a korábbi feltételezést, hogy a mutációk LPS géneket érintenek. A fág rezisztens mutánsok esetében a PAGE géleken KPS-t nem detektáltunk, míg a fág szenzitív mutánsokból izolált KPS a vad típussal megegyezőnek bizonyult.

A mutánsok szimbiótikus képességeit gümőzési tesztben vizsgáltuk. A KPS és LPS termelésben egyaránt hibás mutánsok egyben képtelenek voltak effektív szimbiózis létrehozására, azaz Fix$^-$, míg a csak eltérő LPS mintázatot mutató törzsek Fix$^+$ fenotípust mutattak (19. ábra).

4.3.1.1. Az *rkp-2* régió szekvencia analízise

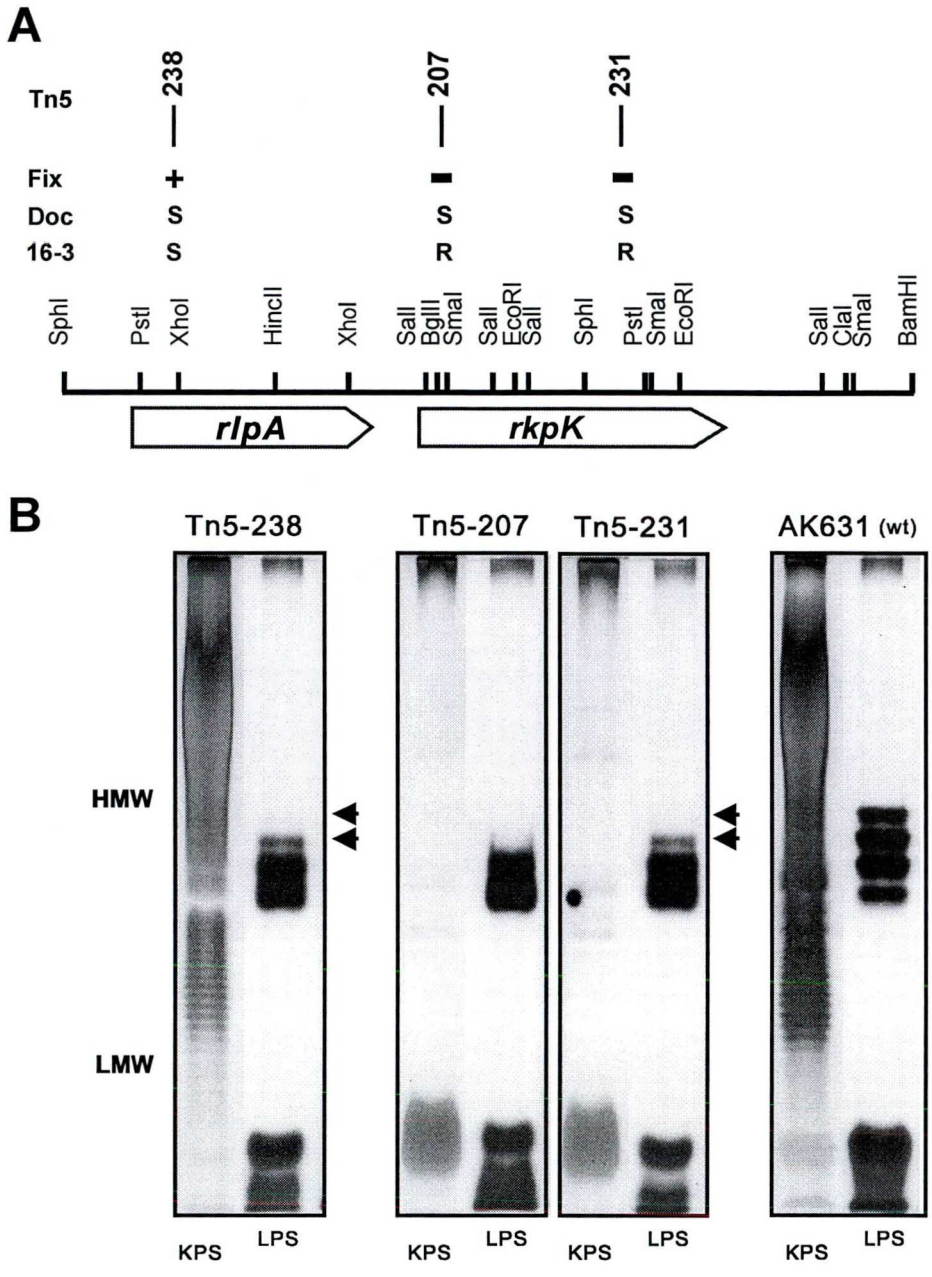
A régióban található gének megismerése érdekében meghatároztuk a nukleotidsorrendjüket. A számítógépes szekvencia analízis 2 egyirányban átíródó, *Rhizobiumokra* jellemző kodonhasználatot mutató ORF jelenlétét valószínűsítette (19. ábra). Mindkét ORF előtt azonosítottunk az *E. coli* promóter szekvenciához (-35, -10 régió) hasonló motívumokat, valamint riboszóma kötőhelyeket, amiből arra következtettünk, hogy a két ORF feltehetőleg különálló transzkripciós egységet alkot. Hipotézisünk helyességét plazmid integrációs mutagenezis segítségével sikerült bizonyítani.

A Tn5 inszerciók pontos helyét, mint az *rkp-1* régió esetében is, a transzpozont határoló IR szekvenciához tervezett primerrel való szekvenálással határoztuk meg. Az így kapott szekvencia adatok analízise során kiderült, hogy csak a második ORF-be térképeződő Tn5

inszerciók okoznak 16-3 fágra rezisztens, KPS$^-$ és Fix$^-$ fenotípust, míg az első ORF-be ékelődött transzpozonok csak az LPS szintézist befolyásolják. Ezek alapján a KPS termelésért felelős második ORF-et *rkpK*-nak, míg az LPS előállításában résztvevő első ORF-et *rlpA*-nek neveztük el.

Az *rlpA* feltételezett fehérje terméke 307 aminosav hosszúságú, 38 kDa számított molekulatömegű polipeptid, amely különböző nukleotid-difoszfo cukrok szintézisében résztvevő epimeráz enzimekkel mutat hasonlóságot. A legnagyobb homológiát (51% aminosav azonosság, 67% hasonlóság) a *Staphylococcus aureus* kapszuláris poliszacharidjának szintéziséhez szükséges N-acetil-amino-galakturonsav előállításában résztvevő CapI proteinnel kaptuk (Lin és mtsai, 1994). Hasonló mértékű aminosav egyezést kaptunk az *E. coli* poliszacharidok lánchosszúságát meghatározó *cld* régióban kódolt epimerázzal (Bastin és mtsai, 1993), valamint a *Streptococcus pneumoniae* UDP-galakturonsav epimerázával (Munoz és mtsai, 1997). Érdekes módon csak nagyon korlátozott mértékű homológiát (22.9% aminosav azonosság) kaptunk a *R. meliloti* EPS szintéziséhez szükséges, bizonyítottan UDP-glükóz epimeráz aktivitású ExoB proteinnel (Buendia és mtsai, 1991).

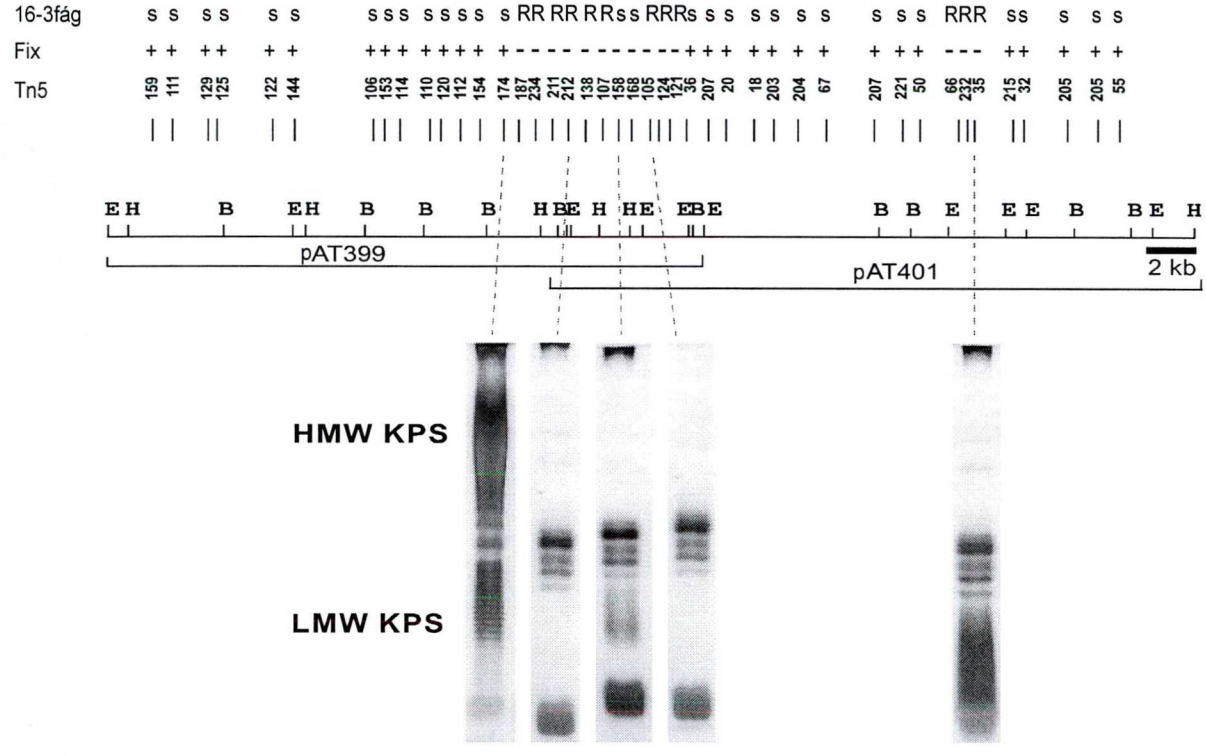
A *rkpK* egy 437 aminosav hosszúságú, 47,2 kDa molekulatömegű fehérjét kódol, ami difoszfo-cukor dehidrogenázokkal mutat több mint 50%-os hasonlóságot. Az *rkpK* UDP-glükóz dehidrogenáz funkcióját enzimaktivitás méréssel is bizonyítottuk. Az *rkpK* mutációja esetén specifikus enzimaktivitást nem tudtunk kimutatni, míg a pAT330 komplementáló klón bevitelével az UDP-glükóz dehidrogenáz aktivitás helyreállt, sőt 9-szer magasabb volt, mint a vad típusú kontrolban (Kereszt és mtsai, beküldve).



19. ábra. A: az *rkp-2* régió 3,6 kb hosszúságú *SphI-BamHI* fragmentjének genetikai térképe. Feltüntettük a vizsgált Tn5 mutációk helyét, fenotípusát (Fix= nitrogénkötési képesség; Doc= dezoxi-kólsav érzékenység; 16-3= fágszenzitivitás/rezisztencia) a régió szubklónozásához használt restrikciós enzimeket, valamint a két azonosított gén helyzetét. **B:** a vizsgált mutánsok LPS és KPS mintázata. A nyílhegyek a vad típustól való eltéréseket jelzik.; HMW=nagy molekulatömegű KPS/LPS, LMW=kis molekulatömegű KPS/LPS.

4.3.2. Az *rkp-3* régió kezdeti analízise

A régió vizsgálatakor az előzőekben jól bevált stratégiát követtük. Az egymással átfedő pAT339 és pAT401 kozmid klónokon irányított Tn5 mutagenezist hajtottunk végre. A mutációkat homológ rekombinációval visszajuttattuk az AK631 genomba, majd a 16-3 fágra rezisztens rekombinánsokat restrikciós emésztések és Southern hibridizáció segítségével térképeztük (20. ábra).



20. ábra. Az *rkp-3* régió genetikai térképe és mutánsainak poliszacharid mintázata. A Tn5 inszerciók helyét függőleges vonalak mutatják. A mutánsok fenotípusát az előző ábrával megegyezően jelöltük. B=*Bam*HI, E=*Eco*RI, H=*Hind*III. Alul egyes reprezentatív mutánsok KPS mintázatát mutatjuk be.

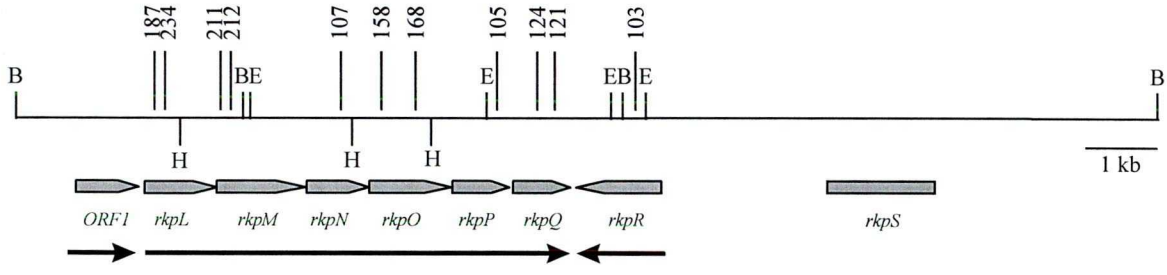
A fágrezisztens mutációk túlnyomó többsége egy csoportba, a két kozmid átfedő régiójába esett, csupán három mutáció térképeződött a pAT401 közepére. A mutánsok szimbiótikus képességeit növényi tesztben ellenőriztük, az általuk termelt poliszacharidokat pedig PAGE géleken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a 16-3 fággal szemben rezisztens baktériumok mind Fix$^-$ és KPS$^-$ fenotípusúak. A fenti eredmények mind egybevágtak az előző két régiónál tapasztaltakkal. Ezért feltételeztük, hogy ez esetben is a Tn5 inszerciók olyan géneket érintettek, amelyek a KPS szintézisével vagy exportjával

kapcsolatosak. Érdekes módon két mutáns (AT158, AT168) megőrizte a vad típusra jellemző fág szenzitivitását, azonban a fág rezisztens mutánsokkal megegyezően Fix$^-$ és HMW KPS$^-$ fenotípust mutattak (20. ábra). Feltehetőleg ezeknek a mutánsoknak a sejtfelszínén a szimbiótikus funkció betöltéséhez kevés, PAGE vizsgálattal már kimutathatatlan mennyiségű KPS található, amely még elegendő tapadási helyet szolgáltat a 16-3 fágok számára.

A régió mutációk által behatárolt darabját a 19. ábrán feltüntetett restrikciós enzimek segítségével szubklónoztuk. Meghatároztuk a két kozmid klón átfedő, 8,5 kb hosszúságú darabjának nukleotid sorrendjét, a pAT401 klón további szekvenálása pedig folyamatban van. Ezeddig az átfedő szakaszon 8 ORF-et azonosítottunk, melyek közül az első hét balról jobbra, míg az utolsó ezzel ellentétesen íródik át (21. ábra). A Tn5 inszerciók pontos helyének, a határoló szekvenciák meghatározásával való megállapítása során kiderült, hogy az első Fix$^-$ és KPS$^-$ fenotípust valamint fágrezisztenciát okozó transzpozon (AT187) a második ORF-be térképeződik. Ebből következőleg valószínűsíthető, hogy az első ORF által meghatározott fehérje, amely hidroxi-metil transzferázokhoz hasonló, nem játszik szerepet a KPS termelésben, és a szimbiózis során. Az első két ORF között található több mint 600 bp-os távolság, valamint a második ORF (*rkpL*) előtt azonosított, az *E. coli* promóterekhez hasonló, -35-ös és -10-es régió, valamint riboszóma kötőhely további bizonyítékul szolgálnak arra, hogy az első ORF a többitől független. A további konzerválódott promóter szekvenciák hiánya, valamint az ORF-ek közötti kis távolság (1-20 bp) arra enged következtetni, hogy a hat, azonos irányú gén (*rkpLMNOPQ*) egy transzkripciós egységet alkot, míg a nyolcadik, ellentétes orientációjú ORF (*rkpR*) ezektől függetlenül íródik át.

Előzetes szekvencia adatok alapján a pAT401 klónban még egy OFR-et (*rkpS*) azonosítottunk, aminek pontos helyzete és orientációja azonban még nem ismert. Adatbanki protein szekvenciákkal összevetve az új *rkp* gének által meghatározott fehérjék különböző cukor, illetve poliszacharid bioszintézisben résztvevő enzimekkel mutatnak

hasonlóságot (3. táblázat). Első pillantásra szembeötlő az *rkp-3* régióban kódolt, és a *Methanococcus jannaschii* kapszuláris poliszacharidjának bioszintézisében résztvevő proteinek (Bult és mtsai, 1996) közötti nagyfokú hasonlóság, hiszen a nyolc feltételezett Rkp fehérjéből öt különböző Sps proteinnel mutat homológiát, amiből arra lehet következtetni, hogy e két baktérium KPS bioszintézise hasonló séma alapján mehet végbe. Sajnos az Sps proteinek pontos biokémiai funkciója még ismeretlen, ezért ezekből a homológiákból nem tudunk messzemenő következtetéseket levonni. Szerencsére más enzimekkel való hasonlóságukat alapul véve következtetni tudunk az általunk azonosított gének lehetséges feladatára. A szekvencia homológiákon túl az *rkpLMNOPQ,R* gének KPS bioszintézisben betöltött szerepére utal, hogy mutációjuk a KPS mintázat megváltozását eredményezte (20. ábra).



21. ábra. Az *rkp-3* régióban azonosított gének térképhelyzete. A függőleges vonlak a Tn5 inszerciókat jelzik. Az ábra alján látható fekete nyilak a feltételezett transzkripciós egységeket mutatják.

Az *rkpL* fehérje terméke 334 aminosav hosszúságú, 37,2 kDa molekulatömegű polipeptid, amely a *Methanococcus jannaschii* SpsD proteinjével mutat 45%-os aminosav azonosságot. Hasonló mértékű aminosav egyezést mutattunk ki számos más baktériumban azonosított hexóz epimerázokkal és dehidratázokkal, amelyek nukleotid difoszfáttal aktivált cukormolekulák átalakításában vesznek részt.

Az *rkpM* által meghatározott polipeptid 384 aminosav hosszúságú, 42,4 kDa molekulatömegű fehérje, amely 35%-os aminosav azonosságot mutat a *Methanococcus jannaschii* SpsC proteinjével. További hasonlóságot fedeztünk fel az RkpM és a *Bordatella*

pertussis bplF génje által kódolt galaktóz transzferáz között, ami a KPS polimerizációját indítja el azáltal, hogy az első cukormolekulát kapcsolja arra a lipid hordozóra, amelyen a kapszuláris poliszacharid szintézise történik (Allen és mtsai, 1996).

Az *rkpN* egy 227 aminosav hosszúságú, 25,7 kDa molekulatömegű fehérjét kódol, ami az *E. coli* NeuA (Zapata és mtsai, 1996) és KpsU (Pazzani és mtsai, 1993) proteinjeivel mutat 26%-os illetve 28%-os azonosságot. Ezek a fehérjék két KPS alapvegyületnek, az N-acetil neuraminsavnak (NeuNAC), illetve a keto-deoxi-oktulonsavnak (KDO) ciklikus monofoszfáttal (CMP) való aktiválását végzik.

Az *rkpO* által kódolt fehérje 378 aminosavat tartalmaz, molekulatömege 41,1 kDa. Adatbanki szekvenciákkal összevetve az RkpO csak az SpsH proteinnel mutat 31%-os aminosav egyezést, aminek a KPS szintézisben betöltött pontos funkciója még ismeretlen, feltehetőleg egy cukor-transzferáz. Az *rkpO*-t különösen érdekessé teszi, hogy a fejezet elején említett fágszenzitív, de Fix$^-$ fenotípust okozó Tn5 inszerciók (AT158, AT168) ebbe a génbe térképeződtek.

Az *rkpP* gén 177 aminosavat határoz meg, ami egy 21,1 kDa molekulatömegű polipeptidet alkot. Az RkpP csak az SpsG proteinnel mutat 23%-os azonosságot, ami szintén transzferáz enzim lehet.

Az *rkpQ* által kódolt polipeptid 353 aminosav hosszúságú, 38,6 kDa molekulatömegű fehérje, ami nagyfokú homológiát (41% aminosav egyezés) mutat az SpsE proteinnel, valamint az *E. coli* NeuB (32% aminosav egyezés) fehérjéjével (Annunziato és mtsai, 1995), ami a NeuA-val együtt az N-acetil neuraminsav szintéziséért felelős.

Az RkpR 415 aminosavat tartalmazó, 46,1 kDa molekulatömegű polipeptid, amely különböző KPS exportban résztvevő enzimekkel mutat hasonlóságot. A legnagyobb aminosav egyezést (28%) az *E. coli* KpsE proteinjével kaptuk (Russo és mtsai, 1998), amely a KPS periplazmatikus téren keresztül való transzportjában vesz részt. Hasonló mértékű homológiát mutattunk ki más, szintén KPS exportban résztvevő proteinekkel mint

pl. a *Haemophillus influenzae* BexC (Kroll és mtsai, 1990) és a *Neisseria meningitidis* CtrB (Frosch és mtsai, 1991).

Az *rkpS* 413 aminosav hosszúságú, 44,8 kDa molekulatömegű polipeptidet kódol, ami az *E. coli* KpsM (Pavelka és mtsai, 1991) proteinjével mutat 31%-os azonosságot. Hasonló mértékű homológiát mutattunk ki a *Haemophillus influenzae* BexB (Kroll és mtsai, 1990) és a *Neisseria meningitidis* CtrC (Frosch és mtsai, 1991) proteinjével. Ezek az enzimek a kapszuláris poliszacharidok sejtmembránon keresztüli transzportjában vesznek részt. Mivel a pAT401 szekvenciáját még nem határoztuk meg teljes egészében, ezért az *rkpS* gén pontos helyzetét sem ismerjük a pAT399-el átfedő szakasztól közvetlenül jobbra elhelyezkedő 8,5 kb-os *Eco*RI-*Bam*HI fragmenten belül (20. és 21. ábra). Érdekes módon ezen a DNS szakaszon egyetlen 16-3 fágra rezisztenciát okozó Tn5 inszerciót sem azonosítottunk, ami felveti annak a lehetőséget hogy az itt elhelyezkedő gének nem a fág tapadási helyéül szolgáló KPS szintézisében és/vagy transzportjában vesznek részt. Valószínűbbnek tűnik azonban az a feltételezés hogy, nem minden *rkp* génben okozott mutáció jár együtt fágrezisztens fenotípussal. Ezt támasztja alá az *rkpH* génbe térképeződő PP618 (ld. *rkp-1* régió), valamint az *rkpO*-ba ékelődött AT158 és AT168 Tn5 inszerció, amelyek szintén nem okoztak fágrezisztens fenotípust.

A pAT401-ben szigetszerűen elhelyezkedő, fágrezisztenciát okozó (AT66, AT232, AT35) Tn5 inszerciókat határoló szekvenciákat adatbankokkal összehasonlítva nem kaptunk meggyőző homológiákat. Valószínűleg ezek a mutációk új típusú gént, vagy géneket érintenek.

A feltételezett Rkp proteinek másodlagos szerkezetének számítógépes vizsgálata során kiderült, hogy az RkpP és RkpQ kivételével az összes polipeptidben kimutathatók erősen hidrofób szakaszok, amelyek valószínűsítik, hogy ezek a fehérjék vagy a sejtmembránba ágyazódnak, vagy hidrofób doménjeikkel összekapcsolódva enzimkomplexeket hoznak létre. Az RkpR és RkpS proteinekben ezek a hidrofób motívumok membránátívelő szakaszokat is alkothatnak, amelyek vagy a sejtmembránhoz való erős kapcsolódásban,

vagy transzportkomplexekre jellemző membránpórusok kialakításában játszhatnak szerepet. Ezeket a számítógépes predikciókat alátámasztják irodalmi adatok is, melyek szerint a kapszuláris poliszacharidok szintézise a sejtmembrán belső feléhez lazán kapcsolódó enzimkomplexek közreműködésével megy végbe (Whitfield and Valvano, 1993), a poliszacharidok exportjában pedig membránpórusokat alkotó transzportkomplexek, az un, ABC-transzporterek vesznek részt (Higgins, 1992).

Gén	Feltételezett funkció	Homológ gén	*Baktérium*	Homológ protein	Aminosav azonosság/hasonlóság (%)	Hivatkozás
orf1	hidroxi-metil transzferáz	*panB*	*Mycobacterium tuberculosis*	3-metil-2-oxobutanoát hidroximetil-transzferáz	25/36	sp:Q10505
			Bacillus subtilis		25/40	sp:P52996
			E. coli		25/40	Jones és mtsai, 1993
rkpL	dNDP-hexóz dehidratáz/ epimeráz	*spsD*	*Methanococcus jannaschii*	poliszacharid szintézis gén	45/65	Bult és mtsai, 1996
		cap5E	*Staphylococcus aureus*	UDP-glükóz epimeráz	42/58	Sau és mtsai, 1997
rkpM	hexóz-transzferáz	*spsC*	*Methanococcus jannaschii*	poliszacharid szintézis gén	35/56	Bult és mtsai, 1996
		bplF	*Bordatella pertussis*	galaktóz-transzferáz	33/50	Allen és mtsai, 1996
rkpN	KDO-aktiválás	*neuA*	*E.coli*	CMP-NeuNAC szintáz	26/42	Zapata és mtsai, 1989
		kpsU	*E.coli*	CMP-KDO szintáz	28/54	Pazzani és mtsai, 1993
rkpO	?	*spsH*	*Methanococcus jannaschii*	poliszacharid szintézis gén	27/48	Bult és mtsai, 1996
rkpP	?	*spsG*	*Methanococcus jannaschii*	poliszacharid szintézis gén	23/38	Bult és mtsai, 1996
rkpQ	KDO szintézis	*spsE*	*Methanococcus jannaschii*	poliszacharid szintézis gén	41/57	Bult és mtsai, 1996
		neuB	*E.coli*	NeuNAC-kondenzáló enzim	32/50	Annunziato és mtsai, 1995
rkpR	KPS export a periplazma-tikus téren keresztül	*kpsE*	*E.coli*	KPS export protein	28/50	Russo és mtsai, 1998
		bexC	*Haemophilus influenzae*		27/51	Kroll és mtsai, 1990
		ctrB	*Neisseria meningitidis*		27/50	Frosch és mtsai, 1991
rkpS	KPS export a sejtmembrá-non keresztül	*kpsM*	*E.coli*	KPS export protein	31/56	Pavelka és mtsai 1991
		bexB	*Haemophilus influenzae*		25/57	Kroll és mtsai, 1990
		ctrC	*Neisseria meningitidis*		24/55	Frosch és mtsai, 1991

3. táblázat. Az *rkp-3* régióban azonosított gének és homológjaik. A közlés előtt álló szekvenciák esetében a SWISS-PROT adatbank hivatkozási számait adtuk meg.

5. MEGVITATÁS

A dolgozat a *Rhizobium meliloti* 41 olyan géncsoportjainak analízisét mutatja be, amelyek egyaránt szerepet játszanak a baktérium kapszuláris poliszacharidjainak szintézisében, és sejtfelszínre való juttatásában, következésképpen a gazdanövénnyel való szimbiózis kialakításában.

Az általunk izolált három független géncsoportban közös, hogy a gének mutációja esetén (a) a baktériumok nem képesek effektív szimbiózis létrehozására a lucerna növénnyel (az *rlpA* kivételével), (b) a mutáns baktériumok sejtfelszínén (négy kivételével) nem képesek megtapadni a 16-3 fág részecskék, (c) sejtfelszíni poliszacharidjaik mennyisége és/vagy mintázata megváltozik.

5.1. A *rkp* mutánsok pleiotróp fenotípusa

A *Rhizobiumok* szimbiótikus képességének hiányát (Fix^-) okozhatja: (a) a nitrogénkötéssel (Nif^-), valamint (b) a baktériumok megváltozott fiziológiai környezetéhez való alkalmazkodás biztosításával kapcsolatos enzimfunkciók hibája (táp- és energiaellátás, NH_3 transzport), vagy (c) olyan egyéb funkciók hiánya, melynek következtében a baktériumok nem képesek behatolni a fejlődő gümősejtekbe (Inf^-). Egyes *R. meliloti* EPS (Leigh és mtsai, 1987; Long és mtsai, 1988), valamint más *Rhizobiumok* LPS (de Maagd és mtsai, 1989; Priefer és mtsai, 1989) mutánsai Inf^- fenotípusúak, ami bizonyítja, hogy a sejtfelszíni poliszacharidok döntő szerepet játszanak a szimbiótikus gümő inváziójában. Érdekes módon a *R. meliloti* AK631 törzse annak ellenére, hogy az *exoB* gén spontán mutációja következtében nem termel EPS-t, más *Rhizobium* törzsek *eps* mutánsaival ellentétben megőrzi Fix^+ fenotipusát. Csoportunk korábbi vizsgálataiból kiderült, hogy az *rkp-1* régió mutánsai csak AK631 (EPS^-) háttérben okoznak Inf^- fenotípust (Putnoky és mtsai, 1990), mely feltételezte olyan stuktúra meglétét, amely pótolhatja az EPS-t bizonyos körülmények között.. A későbbiekben bizonyítást nyert, hogy az *rkp-1*,és a közelmúltban izolált *rkp-2* és *rkp-3* régió mutánsai is sejtfelszíni poliszacharidok (KPS, LPS)

termelésében hibásak (Putnoky és mtsai, 1990; Petrovics és mtsai, 1993, Kiss és mtsai, 1997; Kereszt és mtsai, beküldve). Az *rkp* mutációk esetében az Inf$^-$ fenotípus egyik lehetséges magyarázata tehát, hogy a gazdanövény nem kapja meg a gümőfejlődés ezen stádiumában szükséges bakteriális szignál molekulát, amely egy- vagy többféle sejtfelszíni poliszacharid jellegű molekula.

A vad típustól különböző sejtfelszín az oka a mutáns baktériumok eltérő fág-rezisztenciájának is. A mutációk következtében feltehetőleg megváltozott, vagy eltűnt a 16-3 fág sejtfelszíni receptoraként funkcionáló poliszacharid, melynek következtében a mutánsokon nem képesek megtapadni a fág részecskék (Putnoky és mtsai, 1990). Ezt támasztja alá, hogy a kis mennyiségű KPS-t termelő PP608 és PP618 mutánsok részben megőrizték fágszenzitivitásukat, míg a KPS termelésére képtelen *rkp* mutánsok mind fágrezisztensek lettek.

A sejtfelszíni poliszacharidok szerepe a gazda szervezet általi felismerés folyamatában mind a patogén (Cross, 1990), mind a szimbionta (Kannenberg és Brewin, 1994) baktériumok esetében bizonyított. A humán patogén baktériumok poliszacharid burka védelmet jelent a fagocitózis és a komplement-rendszer által indukált bakteriolízis ellen (Jarvis és Vedros, 1987), ennek hiányában a kórokozók nem képesek megfertőzni a célsejteket.

A KPS szerepe a szimbionta-gazdanövény interakcióban azonban nem ilyen egyértelmű. A vad típusú *Rhizobiummal* valamint patogén baktériumokkal fertőzött növényben egyaránt megfigyelhető a salkon szintáz és más, a fenilpropanoid bioszintézis útba tartozó gének expressziójának növekedése. Az indukció kinetikája azonban a két esetben különböző, jelezve, hogy a szimbionta baktérium által kiváltott válasz nem azonos a kórokozók által indukált védekezési mechanizmusokkal. Fix$^-$ *Rhizobiumokkal* fertőzött lucernában szintén emelt szintű salkon szintáz génexpressziót mutattak ki, amiből arra következtettek, hogy ezek a baktériumok indukálják a gazdanövény védekezési mechanizmusait (Grosskopf és mtsai, 1992). Egy másik kísérleti renszerben, vad típusú

Rhizobiumokat lucerna levélbe oltva a védekezési gének egy igen gyors, átmeneti, majd néhány óra elteltével egy erősebb, hosszantartó aktiválódása figyelhető meg (Bequart-de Kozak és mtsai, 1997). Meglepő módon az AK631 törzs *rkp-1* régiójának mutánsai (EPS^-, KPS^-, Fix^-) nem váltják ki a salkon szintáz, salkon reduktáz és az izoflavon reduktáz gének gyors és átmeneti expresszióját, csak a másodikat (Bequart-de Kozak és mtsai, 1997). Ugyanezeket az *rkp-1* mutációkat *R. meliloti* 41 (EPS^+, KPS^-, Fix^+) háttérben vizsgálva a védekezési gének expressziójának első fázisa szintén elmaradt, ami bizonyítja, hogy az EPS jelenléte az adott kísérleti körülmények között nem befolyásolta ezeknek a géneknek korai működését. Azaz, a fent említett gének indukciójához a KPS molekulák jelenléte szükséges (Bequart-de Kozak és mtsai, 1997). A levél-injektálásos kísérletek alapján a KPS-specifikus növényi génexpresszió változás feltehetőleg a növény-baktérium kommunikáció egy közbülső állomása, ami után mindkét partner részéről további szignál molekulák jelenléte vagy hiánya viszi a folyamatot a védekezési reakció, avagy a szimbiótikus együttműködés irányába.

5.2. Az *rkp* gének feltételezett szerepe, a rhizobiális KPS szintézisének modellje

A kapszuláris poliszacharidok bioszintézise általában a következő főbb lépésekből áll: (a) a cukor molekulák szintézise, (b) a cukormolekulák aktiválása, (c) az aktivált cukrok polimerizációja, (d) az alapláncmódosítása, (e) a kész molekula transzportja a sejt felszínére.

A *R. meliloti* kapszuláris poliszacharidja valószínűleg egy KDO variánsból, α-keto-3,5,7,9-tetradeoxi-5,7-diamininononulonsavból és 4-deoxy-4-amino-glükuronsavból épül fel (Reuhs 1997). Ez utóbbi komponens szintézisében feltehetőleg az *rkp-2* régióban található RkpK protein és különböző *exo* gének vehetnek részt. A szintézis első lépéseként az *exoC* gén által kódolt foszfoglüko-mutáz enzim glükóz-6-foszfátból glükóz-1-foszfátot állít elő. Az *exoC* gén különböző poliszacharidok szintézisében betöltött központi szerepére utal, hogy a gén mutációja nem csak az EPS, hanem a KPS bioszintézisét is befolyásolja. Más

exo mutációkkal ellentétben ugyanis a *R. meliloti* 41 *exoC* mutánsa egyben Fix⁻ fenotípusú is, ami a KPS hiányára enged következtetni (Brzoska és Signer 1991).

A glükóz-1-foszfát aktiválását UDP-glükózzá az *exoN* gén által kódolt pirofoszforiláz enzim katalizálja. Az *exoN* gén mutációja azonban nem okozza az EPS termelés teljes hiányát, ami arra enged következtetni, hogy a *R. melilotiban* egy másik UDP-glükóz pirofoszforilázt kódoló génnek is kell lennie (Becker és mtsai, 1993a), amely képes az *exoN* feladatát részben ellátni. Az UDP-glükózt az RkpK enzim oxidálja UDP-glükuronsavvá, amit feltehetően az *rkp-3* régióban kódolt enzimek alakítanak 4-deoxy-4-amino-glükuronsavvá.

A másik alapvegyület, a KDO szintéziséért majd az azt követő aktiválásáért valószínűleg az *rkp-3* régióban kódolt *rkpQ* és *rkpN* gén terméke felelős, amelyek más baktériumok fő KPS-prekurzorainak a szintézisében és aktiválásában résztvevő gén-párokkal mutatnak hasonlóságot.

Régió	Gén	Feltételezett fehérje termék	Funkció
rkp-1	*rkpA*	β-ketoacil-szintáz	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpB*	aciltranszferáz	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpC*	dehidratáz	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpD*	enoil-reduktáz	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpE*	keto-reduktáz	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpF*	acil carrier protein	lipid hordozó szintézis
rkp-1	*rkpG*	aciltranszferáz	módosítás/transzport
rkp-1	*rkpH*	dehidrogenáz	módosítás/transzport
rkp-1	*rkpI*	?	módosítás/transzport
rkp-1	*rkpJ*	lipid transzport protein	módosítás/transzport
rkp-2	*rlpA*	epimeráz	LPS szintézis
rkp-2	*rkpK*	UDP-glükóz dehidrogenáz	amino-hexuronsav szintézis
rkp-3	*rkpL*	UDP-glükóz epimeráz	amino-hexuronsav szintézis
rkp-3	*rkpM*	galaktóz-transzferáz	az első cukoregység kapcsolása a lipid hordozóhoz
rkp-3	*rkpN*	CMP-KDO szintáz	KDO-aktiválás
rkp-3	*rkpO*	poliszacharid szintézis gén	alegységek polimerizációja?
rkp-3	*rkpP*	poliszaccharid szintézis gén	alegységek polimerizációja?
rkp-3	*rkpQ*	KDO-szintézis protein	KDO szintézis
rkp-3	*rkpR*	KPS export protein	KPS export a periplazmatikus téren keresztül
rkp-3	*rkpS*	KPS export protein	KPS export a sejtmembránon keresztül

3. táblázat. Az *rkp* gének és az általuk kódolt fehérjék feltételezett funkciójának összefoglalása

A prekurzor molekulák poliszacharid lánccá való polimerizálása egy, a sejtmembrán belső feléhez kihorgonyzott hordozón megy végbe. A lánc növekedése kétféleképpen történhet: (a) közvetlenül egymás után kapcsolódó prekurzor molekulák útján, (b) vagy a monoszacharid egységekből előbb egy kis tagszámú oligomer szintetizálódik egy köztes lipid hordozón (ami általában undekaprenol-foszfát), majd ezeknek az ún. ismétlődési egységeknek összekapcsolódásával jön létre a kész polimer (Jann és Jann, 1990). Egy második lipid hordozó részvételét a KPS polimerizációban és transzportban alátámasztják több Gram-negatív baktérium vizsgálata során nyert kísérleti adatok is (Whitfield és Valvano, 1993). *E. coliban* a KPS-t felépítő oligoszacharid ismétlődési egységek a citoplazmamembrán belső feléhez kapcsolódó baktoprenol-foszfáton szintetizálódnak. A *kpsD* mutánsban viszont foszfatidsavhoz kötött KPS periplazmatikus térben való felhalmozódását mutatták ki (Kröncke és mtsai, 1990). Tehát az ismétlődési egységek polimerizációja, vagy a polimer sejtmembránon keresztüli transzportja során a KPS molekulák az oligoszacharid egységek polimerizációjának színteréül szolgáló elsődleges lipid hordozóról egy második lipid molekulára kerülnek át.

A *Rhizobium meliloti* KPS szintézise feltevéseink szerint több lépésben történik. Először KDO-ból és amino-glükuronsavból álló diszacharid egységek jönnek létre, amelyek egy, az EPS-ek és az LPS-ek bioszintézisében is szerepet játszó membránkötött elsődleges hordozón 10-15 tagszámú oligomerekké szintetizálódnak az *rkp-3* régióban kódolt, poliszacharid szintézis fehérjékkel homológ enzimek közreműködésével. Ezek a kb. 5-7 kDa molekulatömegű cukorláncok egy KPS specifikus, az *rkp-1* régióban kódolt zsírsav szintáz enzimek (RkpABCDEF) által előállított lipid hordozóra kerülnek át az RkpGHI,J fehérjék közreműködésével, és szerelődnek össze HMW-KPS-é. Feltételezésünket alátámasztja, hogy az *rkp-1* régióban okozott egyes mutációk (*rkpABCDEF* és *J*) hatására csak alacsony molekulatömegű (LMW) KPS képződik, míg az *rkpGHI* mutációja esetén különböző mértékben redukált méretű KPS termelődik, ami a sejtekben halmozódik fel. A kapszuláris poliszacharidok lipid molekulákhoz való kapcsolódása a Gram-negatív

baktériumok (*E. coli*, *Neisseria meningitidis*) KPS transzportjának elengedhetetlen feltétele (Bronner és mtsai, 1993ab; Frosch és mtsai, 1993; Pazzani és mtsai, 1993). A második lipidhez való kapcsolódásért *E. coli*ban a KpsS fehérje (Bronner és mtsai, 1993b), *R. melilotiban* feltehetőleg a vele homológ RkpJ felelős. A kódoló gének mutációja mindkét esetben a KPS citoplazmában való felhalmozódását eredményezi, a *kpsS* hiányában azonban a poliszacharid polimerizációs fokának emelkedését írták le (Bronner és mtsai, 1993a), míg az *rkpJ* génben hibás *Rhizobium* csak alacsony polimerizációs fokú (LMW) KPS termelésére képes. A *kpsS* és az *rkpJ* gének mutációja által okozott eltérő fenotípust magyarázhatjuk úgy, ha feltételezzük, hogy a második lipid molekula a két mikroorganizmusban a KPS szintézis eltérő szakaszaiban játszik főszerepet. *E. coliban* feltehetőleg a kész polimer kerül át a második lipidre, közvetlenül a sejtfelszínre való transzport előtt, így a lipidcsere hiányában a KPS lánc tovább nőhet az elsődleges lipid hordozón. *R. melilotiban* a második lipid az oligoszacharid egységek polimerizációjában játszhat elsődleges szerepet. Ezt támasztja alá, hogy az *rkpJ* mutációja következtében csak LMW KPS képződik, mivel a második lipid hordozóhoz való kapcsolódás hiányában a további polimerizáció gátolt.

A poliszacharidok polimerizációs fokát az ún. *cld* (chain lenght determinant) gének szabályozzák (Batchelor és mtsai, 1992; Dodgson és mtsai, 1996; Franco és mtsai, 1996; Stevenson és mtsai, 1995). *Rhizobium melilotiban* az *E. coli kpsC* génjével homológ *rkpZ* látja el ezt a feladatot (Pazzani és mtsai, 1993; Reuhs és mtsai, 1995). A nagyfokú szekvencia azonosság ellenére a két gén feladata részben eltérő. A *kpsC* mutációja befolyásolja a poliszacharid szerkezetét, méretét és a sejtfelszínre való exportját is (Bronner és mtsai, 1993a,b), míg az *rkpZ* mutációja csak a molekula méretre van hatással (Reuhs és mtsai, 1995). Az RkpZ protein nem esszenciális a KPS termeléshez, hiánya esetén a vad típusúval megegyező mennyiségű és alapszerkezetű, de nagyobb polimerizáltsági fokú KPS található a *Rhizobiumok* felszínén. Működőképessége nem korlátozódik a *R. melilotira*, mivel az *rkpZ* gén bevitele az azt nem tartalmazó *R. fredii*

USDA205 törzsbe a KPS molekula méretének csökkenését okozza, annak ellenére, hogy ennek a törzsnek a poliszacharidja szerkezetileg eltér a *R. melilotiétól* (Reuhs és mtsai, 1995). A KpsC hiányában a termelt poliszacharid mennyisége drasztikusan csökken, az nem transzportálódik az *E. coli* felszínére, hanem a sejt belsejében halmozódik fel (Bronner és mtsai, 1993a).

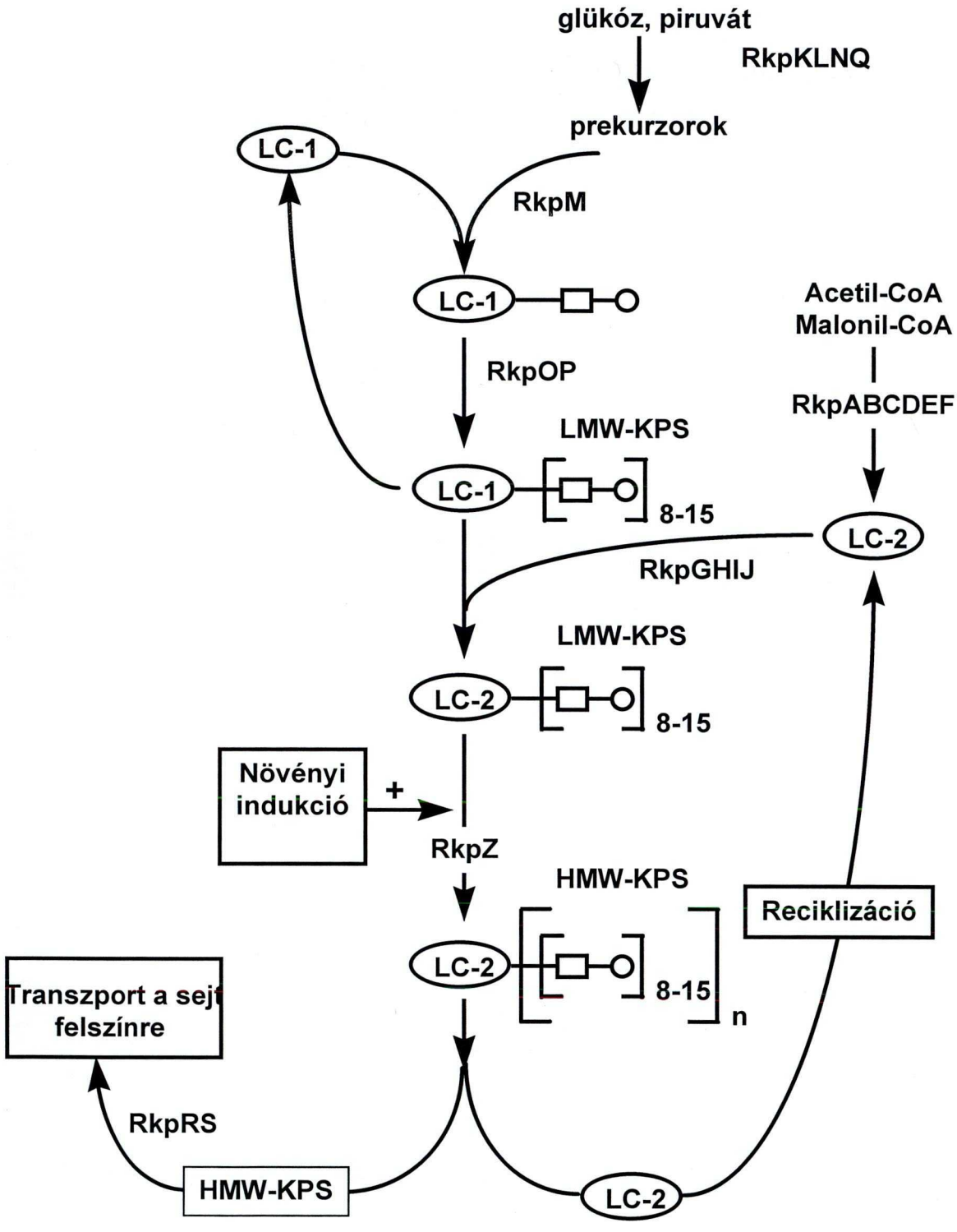
Az RkpZ által meghatározott méret-tartományt elért poliszacharidok előbb a sejtmembránon keresztül a periplazmatikus térbe, majd onnan a sejtek felszínére transzportálódnak. A sejtmembránon keresztül való transzport általában az ún. ABC-transzporterek segítségével történik (Saier, 1994). A transzporter komplexet két fehérje alkotja, amelyek egyike ATP megkötésére és elbontására képes (pl. KpsT), míg a másik (pl. KpsM) erősen hidrofób doménjeivel egy pórust formál a plazma membránon keresztül (Pavelka és mtsai, 1991, 1994). *R. melilotiban* ezt a funkciót feltehetőleg a KpsM-mel homológ RkpS és az ezeddig még nem azonosított KpsT-homológ ATP-áz fehérje látja el. A periplazmatikus téren és a külső membránon keresztüli transzport az *E. coli*ban a KpsE és D proteinek közreműködésével zajlik (Silver és mtsai, 1987; Wunder és mtsai, 1994; Rosenow és mtsai, 1995). A KpsE fehérjével való homológiája alapján *R. melilotiban* az RkpR protein játszhat ilyen szerepet, valószínűleg más fehérjékkel együttműködve.

Az eddig vizsgált kapszuláris poliszacharidok esetében a sejt felszínére jutott molekulák lipid részükkel a külső membránba merülve kihorgonyzódnak (Roberts és mtsai, 1996). Feltételezésünk szerint *R. melilotiban* a KPS-specifikus lipid hordozó reciklizálódik. Erre utal, hogy az izolált KPS molekulák kémiai elemzésével nem sikerült lipid oldalláncot kimutatni, habár lehetséges, hogy a forró fenolos extrakció során a poliszacharidot a lipiddel összekötő gyenge glükozidos kötés felszakad és a lipid rész a tisztítás során elveszik. További bizonyítékul szolgálhat azonban az, hogy a HMW KPS termelése lucerna gyökérkivonat hatására fokozódik (Reuhs és mtsai, 1995), miközben az *rkp-1* gének expressziója nem változik (Petrovics és mtsai, 1993). Növekvő mennyiségű KPS

exportja azonos mennyiségű lipid hordozó segítségével csak úgy képzelhető el, ha a hordozó visszakerül a sejt citoplazmájába.

A sok, feltehetően azonos funkció ellenére a rhizobiális KPS szintézise és exportja nagymértékben eltér az eddig részletesen vizsgált patogén baktériumokétól. Ennek legfőbb oka feltételezésünk szerint a rhizobiális KPS szignál funkciójában keresendő. A *Rhizobiumok* a gazdanövény gyökeréből felszabaduló elicitor molekulák hatására emelkedett szintű KPS termeléssel válaszolnak (Reuhs és mtsai, 1995). Valószínű, hogy az LPS molekulák strukturális adaptációjához hasonlóan (Whitfield, 1995) a baktériumok által szintetizált KPS molekulák szerkezete is változik, azaz a változó környezeti tényezőkhöz alkalmazkodva gyors KPS szintézisre és exportra van szükség. Az exportálható KPS mennyiségét könnyebb fokozni úgy, hogy a HMW KPS már előre összeszerelt és a sejtben tárolt 10-15 egységből álló blokkokból épül fel, mintsem diszacharid prekurzorokból. Másrészről a KPS-specifikus lipid hordozó elősegítheti, hogy a gazdanövény hatására bekövetkező KPS szint emelkedése más, a közös prekurzorokért kompetáló poliszacharidok termelésétől függetlenül következhessen be. Ilymódon a reciklizálódó hordozók meggyorsíthatják a szignálcserét a szimbiótikus partnerek között.

Modellünk az Rkp proteinek homológiák alapján feltételezett funkcióján, valamint a kódoló génekben mutáns baktériumok által termelt KPS vizsgálatával kapott eredményeken alapul. A KPS bioszintéziséhez és sejtfelszínre való transzportjához szükséges gének nagy részét azonosítottuk. Más baktériumok tanulmányozása során nyert adatok alapján azonban még további gének azonosítása várható (pl. *kpsT* homológ). Reméljük a jövőben modellünket a hiányzó gének azonosításával finomíthatjuk, helyességét pedig az egyes lépéseket alátámasztó további kísérleti adatokkal igazolhatjuk.



22. ábra. A kapszuláris poliszacharidok szintézisének modellje *R. meliloti*ban. LC-1 az elsődleges, LC-2 a KPS-specifikus lipid hordozó. A prekurzorokat téglalappal és körrel jelöltük.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat a lucerna partnere, a *Rhizobium meliloti* szimbiótikus gümőfejlődésben résztvevő három géncsoportjának (*rkp1-2-3*) szerkezeti és funkcionális analízisét tárgyalja. Vizsgálataink során a következő eredményekre jutottunk:

-Megállapítottuk, hogy mindhárom régió egy olyan kapszuláris poliszacharid szintéziséért és transzportjáért felelős, amely egyben a 16-3 fág receptoraként is szolgál.

-*rkp* régiók mutánsai Fix$^-$ fenotípusúak, valamint a KPS termelésben és exportban hibásak.

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

-Számítógépes analízissel a három régióban összesen 15 új nyitott leolvasási keretet (ORF) azonosítottunk. Az ORF-eket *orf1*, *rkpGH,I,J,K,LMNOPQ,R,S* és *rlpA* géneknek neveztük el.

-Kimutattuk, hogy a gének (az *orf1* kivételével) által kódolt fehérjék olyan bakteriális fehérjékhez hasonlítanak, melyek szintén sejtfelszíni poliszacharidok szintéziséért és transzportjáért felelősek.

-Saját és kooperációs partnereink eredményei alapján felállítottuk a KPS szintézis és export modelljét *R. melilotiban.*

7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

Symbiotic nitrogen fixation represents a major source of utilisable nitrogen for the organisms in nature and it is of great importance also in agriculture. For that reason, and because of the fundamental cell biological processes involved, the *Rhizobium*-legume symbiosis has been investigated intensively.

The establishment of nitrogen-fixing root nodules is highly specific and requires multiple interactions involving signal exchanges between the partners. The host plant releases specific flavonoid compounds that activate the nodulation (*nod*, *nol*, *noe*) genes in conjunction with the regulator NodD protein. Different flavonoids interact with different Nod proteins and this specific perception represents the first level of host specificity of nodulation (Schultze *et al.,* 1996). The NodD protein binds to conserved sequence elements (*nod* boxes) located in the promoter regions of *nod* operons, forming the *nod* regulon (Rostás *et al.,* 1986). The products of nodulation genes are involved in the biosynthesis and transport of the lipo-chitooligosaccharide Nod signal molecules (Nod factors) required for initiating nodule organogenesis (Lerouge *et al.,* 1990). The basic structure of Nod factors is determined by the common *nodABC* genes which are functionally conserved showing strong sequence similarity in all rhizobia. The *nod* genes determining host specificity code for enzymes required for the host specific substitution of the lipo-chitooligosaccharide backbone. The Nod factors serve as return signals eliciting cortical cell division in the roots of the partner leading to the formation of nodules (Schultze *et al.,* 1993; Dénarié *et al.,* 1996).

Additional communication between the two partners is likely to be required for nodule infection by rhizobia, where cell surface polysaccharides, such as acidic exopolysaccharides (EPS), capsular polysaccharides (KPS) and lipopolysaccharides (LPS) determined by *exo*, *rkp* and *lps* genes, respectively, are implicated.

In *R. meliloti,* the symbiotic partner of alfalfa (*Medicago sativa*), EPS was reported to be involved in the infection process while the importance of the LPS has not been demonstrated so far. The production of EPS I containing octasaccharide repeating units of seven glucose and a galactose, substituted with pyruvyl, acetyl and succinyl groups was shown to be necessary for the infection thread development and the invasion process. It has also been shown that *R. meliloti* had a latent capability to produce a second type of exopolysaccharide, EPS II, containing glucose-galactose disaccharide subunits carrying pyruvyl and acetyl modifications. A second-site mutation allows several EPS I non-producing bacteria to synthesize EPS II and helps to overcome their invasion defect in some host plants, suggesting that EPS II can substitute for EPS I in the infection process (Leigh and Walker 1994).

Recently, it was demonstrated that some rhizobia possess surface polysaccharides analogous to group II K antigens (KPSs) of *Escherichia coli* (Reuhs *et al.,* 1993; Reuhs *et al.,* 1996). In *R. meliloti* this type of surface polysaccharide can also compensate for *exo* mutations suggesting that the KPS can provide the same functions as the EPS during symbiotic nodule development (Petrovics *et al.,* 1993). Though the complete structure of the *R. meliloti* KPS has not yet been determined, present data indicate that it is polymerized from disaccharide repeating units (Reuhs *et al.,* 1995). The KPS isolated from *R. meliloti* showed a banding pattern that corresponds to the degree of polymerization which is affected by the *rkpZ* gene. The low molecular weight (LMW) form of KPS consists of 8-15 repeating units and the high molecular weight (HMW) KPS is composed of 32-40 repeating units. This molecule is likely to be a surface component that binds bacteriophage 16-3, and is structurally analogous to the group II K antigens of *E. coli* (Petrovics *et al.,* 1993; Reuhs *et al.,* 1993).

We have isolated a gene cluster designated as *rkp-1* (formerly *fix-23*) of AK631, an Exo$^-$ derivative of *R. meliloti* 41, required for the KPS production. Mutants in this gene cluster are not able to adsorb the strain-specific bacteriophage 16-3 and cannot invade the plant

host (Putnoky *et al.,* 1990). The *rkp-1* region harbors 10 Open Reading Frames (ORFs) designated as *rkpA-J* genes, respectively, coding for proteins exhibiting high degree of similarity to different domains of fatty acid synthases as well as to enzymes participating in the modification and transfer of capsular polysaccharides (Petrovics *et al.,* 1993; Kiss *et al.,* 1997). These gene products might be involved in the synthesis of a putative lipid anchor of the polysaccharide, or more likely in the production of a specific lipid carrier required for the biosynthesis of the KPS.

The *rkp-1* region does not code for proteins participating in the biosynthesis and polymerization of the KPS precursors, therefore a new screening for mutants was carried out to identify novel *rkp* genes required for these latter functions. Since most of the *rkp* mutants isolated so far were resistant to phage 16-3, by isolating additional phage resistant strains new mutations affecting the KPS synthesis could be collected. These mutants represented two novel *rkp* gene clusters, designated as *rkp-2* and *rkp-3* regions respectively, and were shown to be defective both in KPS-production and in the invasion of the developing nodule.

Molecular genetic analysis of the *rkp-2* region revealed the presence of two ORFs transcribed in the same direction. Analysis of the mutants obtained in the region showed that both genes are required for wild type LPS-production, however only the second ORF designated as *rkpK*, is involved in the synthesis of KPS. The predicted protein products of the two ORFs exhibited high degree of similarity to enzymes necessary for the metabolism of nucleotide-diphospho-sugars. The product of the first ORF (*rlpA*) showed high degree of homology to epimerases, while RkpK shared high degree of identity with different UDP-glucose dehydrogenases. Our results suggest that these two enzymatic activities are probably required for the formation of UDP-galacturonic acid from UDP-glucose, which is the source of galacturonic acid during polysaccharide synthesis.

Nucleotide sequence analysis of the 8.5 kb DNA fragment of the *rkp-3* region harboring most of the phage resistant mutants revealed 8 open reading frames assigned to genes *rkpL-*

S. Homologies of the deduced gene products to proteins of known functions suggest that genes located in the *rkp-3* region encode proteins involved in KPS synthesis and transport. The protein products of the *rkpLNQ* genes are homologous to enzymes participating in the biosynthesis of sugar precursors of the KPS polymer. The *rkpMOP* genes may encode proteins involved in the further polymerization of these precursors. The transport of the mature KPS polymer probably facilitated by the RkpR and RkpS enzymes showing significant homology to KPS transport proteins from other microorganisms.

Based on the biochemical and genetical data gathered so far, we propose a model for KPS production and export in *R. meliloti*. The disaccharide repeating unit of the KPS is composed of α-keto-3,5,7,9-tetradeoxy-5,7-diaminononulonosic acid, a variant of 3-deoxy-d-manno-2-octulosonic acid (KDO) and of a yet undetermined 4-deoxy-4-amino-hexuronic acid which might be 4-deoxy-4-amino-glucuronic acid (Reuhs *et al.,* 1997). The biosynthesis of the latter component involves enzymatic steps catalyzed by the RkpK protein as well as by the protein products of different *exo* genes. As the first step, glucose-6-phosphate is converted to glucose-1-phosphate by the phosphogluco-mutase enzyme encoded by the *exoC* gene. The mutation in this gene affects the synthesis of most of the rhizobial polysaccharides (EPS I, EPS II, LPS, cyclic β-glucan) including KPS, since, in contrast to other *exo* mutants *of R. meliloti* 41, the *exoC* mutant is Fix^- indicating the lack of KPS (Brzoska and Signer 1991). The reversible conversion of glucose-1-phosphate to UDP-glucose is catalyzed by the UDP-glucose pyrophosphorylase encoded by the *exoN* gene. UDP-glucose is oxidized by the RkpK protein to form UDP-glucuronic acid which is in turn converted to the aminohexuronic acid by the enzymes that might be encoded in the *rkp-3* region. The synthesis of the KDO, the other component of the dissacharide repeating unit may be catalyzed by the RkpN and RkpQ enzymes showing similarity to KDO-synthase proteins of different bacteria.

The initial polymerization of the repeating units catalyzed by another set of enzymes encoded in the *rkp-3* region may take place on a lipid carrier anchored to the inner

membrane, yielding oligosaccharides of 10-15 disaccharide units. Exportable polysaccharides may then be assembled on a KPS-specific carrier, determined by the *rkp-1* region, resulting in high molecular weight (HMW) polymers formed from the above mentioned oligosaccharide subunits. There is considerable evidence for the involvement of two lipid carriers in the synthesis and export of surface polysaccharides in Gram-negativ bacteria (Whitfield and Valvano, 1993). Data show that repeat units are made and, at least partially, polymerized on a lipid carrier, such as bactoprenol phosphate, then the polymer is transferred through the cytoplasmic membrane, and ligated to the lipid anchor (lipid-A or phosphatidic acid) found in the mature polysaccharide. *KpsD* mutants of *E. coli* accumulate KPS in the periplasm, that is still attached to phosphatidic acid (Kröncke *et al.*, 1990) suggesting that transfer across the cytoplasmic membrane must involve "trans-lipidation", i.e. transfer from bactoprenol phosphate to phosphatidic acid.

Until a certain size range the polymerization is terminated which might be determined by the *rkpZ* gene product acting as a chain length determinant. Upon termination of the polymerization process, the KPS would be exported to the cell surface possibly in conjunction with the second lipid carrier facilitated by transport proteins like RkpS and RkpT. The *rkpGHI* and *J* genes appear to modify some aspect of this system since mutation in *rkpGHI* genes resulted in limited release of HMW KPS, while the *rkpJ* mutants were the most deficient in KPS polymerization and export, producing only small amounts of LMW KPS that was not exported to the cell surface. The fact that fatty acids were not detected in purified KPS suggests that (a) the lipid molecules are removed during export to the surface, or (b) there is a novel lipophilic molecule that does not contain the usual fatty acids. Genetic data seem to support the assumption that the lipid part is removed from the polysaccharide and then recycled since no induction of the *rkp* genes has been found using *lacZ* reporter gene fusions (Petrovics *et al.*, 1993) even though alfalfa root extracts specifically elicited the increased expression of HMW KPS (Reuhs *et al.*, 1995). Polymerization of larger blocks (of 6000 Da) attached to the second carrier rather than 500

Da repeating units allows a larger pool of subunits to be available, thus a lipid carrier specific for KPS would facilitate and separate the polysaccharide production and export (for example induced by the host plant) from other polysaccharides and the production of KPS could be more easily adjusted to the requirements.

The involvement of the *rkp* genes in the KPS production and transport, is supported in that (a) mutants of the *rkp-2* and *rkp-3* region necessary for the synthesis of the sugar precursors and their polymerization did not produce any KPS, while *rkp-1* mutants, participating in the production of the lipid carrier involved in the further polymerization of the oligosaccharide subunits, produced only the LMW form of the KPS; (b) immunological studies indicate that these LMW molecules are harbored intracellularly indicating that the *rkp-1* region also plays a role in the transport of the KPS to the cell surface.

The surface polysaccharides may have an essential role in symbiotic nodule development, presumably acting as signals for the plant host in some strains (Franssen *et al.,* 1992). In fact, a recent report shows that the KPS of *R. meliloti* AK631 acts to elicit specific mRNA accumulation in alfalfa (Becquart-de Kozak *et al.,* 1997). Another report shows that KPS production by rhizobia is widespread, and these cell surface components are strain-specific antigens (Reuhs *et al.,* 1997), i.e. unlike EPS, the K antigens differ in structure from strain to strain within the same species. These facts, along with the apparent ubiquity of the *rkp* region in rhizobia (including *Agrobacterium*) suggest a somewhat sophisticated mechanism for modifying the bacterial capsule in response to environmental and/or host-plant factors.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK:

KISS, E., REUHS, B.L., KIM, J.S., KERESZT, A., PETROVICS, G., PUTNOKY, P., DUSHA, I., CARLSON, R.W., and. KONDOROSI, A. (1997). The *rkpGHI* and *J* genes are involved in capsular polysaccharide production of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol.179, 2132-2140.

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

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

KISS, E., PETROVICS, GY., PUTNOKY P., KERESZT A., DUSHA, I., KONDOROSI A. (1994). The *fix-23* genes of *Rhizobium meliloti* are involved in the production of a capsular polysaccharide which plays a role in nodule development. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, Edinburgh. (poszter)

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

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

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

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

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

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

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

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

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

9. IRODALOMJEGYZÉK

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

Allen, N.S., Bennett, M.N., Cox, D.N., Shipley, A., Ehrhardt, D.W., and Long, S.R. (1994). Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{++} and H^{+} currents and on cytoskeletal behaviour. In Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. M.J. Daniels, J A E-Osbourn, ed. (Dordrecht: Kluwer), pp. 107-113.

Allen, A. and Maskell, D. (1996). The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. Mol. Microbiol. 19, 37-52.

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

Aman, P., McNeil, M., Franzén, L.E., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1981). Structural elucidation, using HPLC-MS and GC-MS, of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021. Carbohydrate Res. 95:263-282

Annunziato, P.W., Wright, L.F., Vann, W.F., and Silver, R.P. (1995). Nucleotide sequence and genetic analysis of the *neuD* and *neuB* genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. J. Bacteriol. 177, 312-319.

Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F.D., Maillet, F., De Billy, F., Promé, J.C., Dénarié, J., and Truchet, G. (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. Plant Cell 6, 1357-1374.

Argos, P. and Rao, J.K. (1986). Prediction of protein structure. Methods Enzymol. 130, 185-207.

Baron, C. and Zambryski, P.C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme. Annu. Rev. Genet. 29, 107-129.

Bastin, D.A., Stevenson, G., Brown, P.K., Haase, A., and Reeves, P.R. (1993). Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthase, with a novel mechanism for determining chain lenght. Mol. Microbiol. 7, 725-734.

Batchelor, R.A., Alifano, P., Biffali, E., Hull, S.I., and Hull, R.A. (1992). Nucleotide sequences of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (*rol*) from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: protein homology and functional complementation. J. Bacteriol. 174, 5228-5236.

Battisti, L., Lara, J.C., and Leigh, J.A. (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5625-5629.

Bauer, P., Crespi, M., Szécsi, J., Allison, L.A., Schultze, M., Ratet, P., Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (1994). Alfalfa *enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. Plant Physiol. 105, 585-592.

Becker, A., Kleickmann, A., Keller, M., Arnold, W., and Puhler, A. (1993a). Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. Mol. Gen. Genet. 241, 367-379.

Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W., and Pühler, A. (1993b). Analysis of the *Rhizobium meliloti exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo-β-1,3-1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. Mol. Gen. Genet. 238, 145-154.

Becker, A., Ruberg, S., Kuster, H., Roxlau, A.A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H.P., Walker, G.C., and Puhler, A. (1997). The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol. 179, 1375-1384.

Becquart-deKozak, I, Reuhs, B.L., Buffard, D., Breda, C., Kim, J.S., Esnault, R., and Kondorosi, A. (1997). Role of the K-antigen subgrup of capsular polysaccharides in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalafa leaves. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 114-123.

Bergman, K., Gulash-Hoffee, M., Hovestadt, R.E., Larosiliere, R.C., Ronco, P.G., 2d, and Su, L. (1988). Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. J. Bacteriol. 170, 3249-3254.

Boulnois, G.J. and Jann, K. (1989). Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. Mol. Microbiol. 3, 1819-1823.

Boulnois, G.J., Roberts, I.S., Hodge, R., Hardy, K.R., Jann, K.B., and Timmis, K.N. (1987). Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: Definition of three functional regions for capsule production. Mol. Gen. Genet. 208, 242-246.

Boulnois G.J., Roberts I.S. (1990). Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 150, 1-18.

Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41, 459-472.

Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., and Zehnder, A.J.B. (1990). Osmotically induced oligosaccharide and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J. Gen. Microbiol. 136, 2511-2519.

Breedveld, M.W., and Miller, K.J. (1994). Cyclic β-glucans of members of *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. 58, 145-161.

Bronner, D., Sieberth, V., Pazzani, C., Roberts, I.S., Boulnois, G.J., Jann, B., and Jann, K. (1993a). Expression of the capsular K5 polysaccharide of *Escherichia coli*: biochemical and electron microscopic analyses of mutants with defects in region 1 of the K5 gene cluster. J. Bacteriol. 175, 5984-5992.

Bronner, D., Sieberth, V., Pazzani, C., Smith, A., Boulnois, G., Roberts, I., Jann, B., and Jann, K. (1993b). Synthesis of the K5 (group II) capsular polysaccharide in transport-deficient recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 113, 279-284.

Brown, L.R. (1994). Facing food insecurity. In L.R. Brown, C. Flavin, and S. Postel, eds. (London: Earthscan Publications Ltd.),

Brzoska, P.M. and Signer, E.R. (1991). *lpsZ*, a lipopolysaccharide gene involved in symbiosis of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 173, 3235-3237.

Buendia, A.M., Enenkel, B., Koplin, R., Niehaus, K., Arnold, W., and Puhler, A. (1991). The *Rhizobium meliloti exoZ- exoB* fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as a UDP-glucose 4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. Mol. Microbiol. 5, 1519-1530.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., Fitzgerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M., and Venter, J.C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. Science 273, 1058-1073.

Callaham D. and Torrey I.G. (1981) The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can. J. Bot. 59, 1647-1664.

Caetano-Anolles, G., Crist-Estes, D.K., and Bauer, W.D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation Genes. J. Bacteriol. 170, 3164-3169.

Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P. (1991) Plant genetic control of nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 45, 345-382.

Carlson R.W., Kalembasa S., Turowski D., Pachori P., and Noel D., (1987). Characterization of the lipopolisaccharide from *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. J. Bacteriol. 169, 4923-4928.

Cava J.R., Elias P.H., Turowski D.A., and Noel K.D. (1989). *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. J. Bacteriol. 171, 8-15.

Cava, J.R., Tao, H., and Noel, K.D. (1990). Mapping of complementation groups within a *Rhizobium leguminosarum* CFN42. Mol. Gen. Genet. 221, 125-128.

Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., D'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (1994). *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. EMBO J. 13, 5099-5112.

Cross, A.S. (1990). The biological significance of bacterial encapsulation. Current Top. in Microbiol. and Immunol. 150, 87-96.

Dazzo, F.B. and Sherwood, J.E. (1983). Trifoliin A: a *Rhizobium*-recognition lectin in white clover roots. Prog. Clin. Biol. Res. 138, 209-223.

Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe, M., and Pankratz, S.H. (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*- clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1140-1150.

Dean, D.R., Bolin, J.T., and Zheng, L. (1993). Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. J. Bacteriol. 175, 6737-6744.

de Maagd, R.A., Rao, A.S., Mulders, I.H.M., Goose-de Roo, L., van Loosdrecht, M.C.M., Wijffelman, C.A., Lugtenberg, B.J.J. (1989). Isolation and characterisation of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrofobicity in bacterial release from the infection thread. J. Bacteriol. 171, 1143-1150.

Dènariè, J., Debelle, F., and Promè, J.C. (1996). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. 65, 503-535.

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

Dodgson, C., Amor, P., and Whitfield, C. (1996). Distribution of the rol gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. J. Bacteriol. 178, 1895-1902.

Dubois, M., Giles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

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

Duelli, D.M. and Noel, K.D. (1997). Compounds exuded by *Phaseolus vulgaris* that induce a modification of *Rhizobium etli* lipopolysaccharide. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 903-910.

Douglas, C.J., Staneloni, J.R., Rubin, R.A., and Nester, E.W. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. J. Bacteriol. 161, 850-860.

Dylan, T., Telpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofski, M., Nester, E., Helinski, D.R., and Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4403-4407.

Dylan, T., Helinski, D.R., and Ditta, G.S. (1990a). Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1-2)- glucan. J. Bacteriol. 172, 1400-1408.

Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D.R., and Ditta, G.S. (1990b). Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. J. Bacteriol. 172, 1409-1417.

Dyson, T. (1996). Population and food. Global trends and future prospects. Global Environmental Programme, Routledge ISBN 0-415-11975-8

Edwards, U., Muller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1994). Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis serogroup* B. Mol. Microbiol. 14, 141-149.

Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., and Long, S.R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. Science 256, 998-1000.

Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell 85, 673-681.

Eggleston, G., Huber, M.C., Liang, R.T., Karr, A.L., and Emerich, D.W. (1996). *Bradyrhizobium japonicum* mutants deficient in exo- and capsular polysaccharides cause delayed infection and nodule initiation. Mol. Plant-Microbe Interact. 9, 419-423.

Eisenberg, D., Weiss, R.M., and Terwilliger, T.C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 140-144.

Eisenschenk, L., Diebold, R., Perezlesher, J., Peterson, A.C., Peters, N.K., and Noel, K.D. (1994). Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3315-3322.

Felle, H.H., Kondorosi, É., Kondorosi, A., and Schultze, M. (1995). Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. Plant J. 7, 939-947.

Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C., and Signer, E.R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40, 869-877.

Finke, A., Jann, B., and Jann, K. (1990). CMP-KDO-synthetase activity in *Escherichia coli* expressing capsular polysaccharides. FEMS Microbiol. Lett. 57, 129-133.

Forrai, T., Vincze, E., Bánfalvi, Z., Kiss, G. B., Randhawa, G. S. and Kondorosi, A. (1983). Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 153, 635-43.

Forsberg, L.S. and Reuhs, B.L. (1997). Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: Evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. J. Bacteriol. 179, 5366-5371.

Franco, A.V., Liu, D., and Reeves, P.R. (1996). A Wzz (Cld) protein determines the chain length of K lipopolysaccharide in *Escherichia coli* O8 and O9 strains. J. Bacteriol. 178, 1903-1907.

Franssen, H.J., Vijn, I., Yang, W.C., and Bisseling, T. (1992). Developmental aspets of the *Rhizobium*-legume symbiosis. Plant. Mol. Biol. 19, 89-107.

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

Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krausse, B., and Weisgerber, C. (1991). Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram- negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. Mol. Microbiol. 5, 1251-1263.

Frosch, M. and Muller, A. (1993). Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol. 8, 483-493.

Fuhrmann, J. and Wollum, I.I. (1985). Simplified enzyme-linked immunosorbant assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1010-1013.

Geurts, R. and Franssen, H. (1996). Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. Plant Physiol. 112, 447-453.

Gibson, A.H. (1980). Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, Bergersen, F.J., ed John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 139-184.

Glazebrook, J., and Walker, G.C. (1989) A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium* meliloti. Cell 56: 661-672 .

Glucksmann, M.A., Reuber, L., and Walker G.C. (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti:* a model for succinoglycan biosynthesis J. Bacteriol. 175, 7045-7055.

González, J.U., York, G.M., and Walker, G.C. (1996a) *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. Gene 179: 141-146.

González, J.E., Reuhs, B.L., and Walker, G.C. (1996b). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Nat. Ac. Sci. USA 93, 8636-8641.

Graham, L.L., Beveridge, T.J., and Nanninga, N. (1991). Periplasmic space and the concept of the periplasm. Trends. Biochem. Sci. 16, 328-329.

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

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

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

Higgins, C., F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. 8, 67-113.

Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122, 211-237.

Horváth, B., Bachem, C.W.B., Schell, J., Kondorosi, Á (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal, interacting with the *nodD* gene product. EMBO J. 6, 841-848.

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

Jann, K. and Jann, B. (1992). Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. Can. J. Microbiol. 38, 705-710.

Jarvis, G.A. and Vedros, N.A. (1987). Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. Infect. Immun. 55, 174-180.

Jones, C.E., Brook, J.M., Buck, D., Abell, C., and Smith, A.G. (1993). Cloning and sequencing of the *Escherichia coli panB* gene, which encodes ketopantoate hydroxymethyltransferase, and overexpression of the enzyme. J. Bacteriol. 175, 2125-2130.

Jornvall, H., von Bahr-Lindstrom, H., and Jeffery, J. (1984). Extensive variations and basic features in the alcohol dehydrogenase- sorbitol dehydrogenase family. Eur. J. Biochem. 140, 17-23.

Kannenberg, E.L., Rathbun, E.A., and Brewin, N.J. (1992). Molecular dissection of structure and function in the lipopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 using monoclonal antibodies and genetic analysis. Mol. Microbiol. 6, 2477-2487.

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

Kannenberg, E.L., Perotto, S., Bianciotto, V., Rathbun, E.A., and Brewin, N.J. (1994). Lipopolysaccharide epitope expression of *Rhizobium* bacteroids as revealed by in situ immunolabelling of pea root nodule sections. J. Bacteriol. 176, 2021-2032.

Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., and Carlo, D.J. (1978). A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. Anal. Biochem. 85, 595-601.

Keller, M., Roxlau, A., Weng, W.M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W., and Puhler, A. (1995). Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. Mol. Plant-Microbe. Interact. 8, 267-277.

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

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

Kiss, E., Reuhs, B.L., Kim, J.S., Kereszt, A., Petrovics, G., Putnoky, P., Dusha, I., Carlson, R.W., and Kondorosi, A. (1997). The *rkpGHI* and *-J* genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 179, 2132-2140.

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

Koes, R.E., Quattrocchio, F., and Mol, J.N.M. (1993). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays 16, 123-132.

Kondorosi É. and Kondorosi Á. (1986) Nodule induction on plant roots by *Rhizobium*. Trends Biochem. Sci. 11, 296-299.

Kroll, J.S., Loynds, B., Brophy, L.N., and Moxon, E.R. (1990). The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. Mol. Microbiol. 4, 1853-1862.

Kroll, J.S., Zamze, S., Loynds, B., and Moxon, E.R. (1989). Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 171, 3343-3347.

Kröncke, K., Boulnois, G., Roberts, I., Bitter-Suermann, D., Golecki, J.R., Jann, B., and Jann, K. (1990). Expression of the *Escherichia coli* K5 capsular antigen: immunoelectron microscopic and biochemical studies with reconbinant *E. coli*. J. Bacteriol. 46, 307-346.

Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H.D., Puhler, A., and Favelukes, G. (1992). A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. J. Bacteriol. 174, 5941-5952.

Leigh, J.A., Signer, E.R., Walker, G.C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 6231-6235.

Leigh, J.A., Reed, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M., Walker, G.C. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinilate their calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell 51:579-587.

Leigh, J.A. and Coplin, D.L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Microbiol. 46, 307-346.

Leigh, J.A., and Walker, G.C. (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: Synthesis, regulation and symbiotic function. Trends Genet. 10, 63-67.

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

Lin, W.S., Cunneen, T., and Lee, C.Y. (1994). Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 176, 7005-7016.

Long, S., Reed, J.W., Himawan, J., and Walker, G.C. (1988). Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 170, 4239-4248.

Lugtenberg, B., vanAlphen, L. (1983). Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. Biochim.Biophys. Acta 737, 51-115.

Maniatis, T., Fritsch, E.F.a., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In Anonymous Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

McKhann, H.I. and Hirsch, A.M. (1994). Does *Rhizobium* avoid the host response? Curr. Top. Microbiol. Immunol. 192, 139-162.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. In Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Munoz, R., Mollerach, M., Lopez, R., and Garcia, E. (1997). Molecular organization of the genes required for the synthesis of type 1 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*: formation of binary encapsulated pneumococci and identification of cryptic dTDP-rhamnose biosynthesis genes. Mol. Microbiol. 25, 79-92.

Newcomb, W. (1981) Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. Giles, K.L. and Atherly, A.G. (eds). New York: Academic Press, pp. 247-298.

Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. Planta 190, 415-425.

Nikaido, H. and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49, 1-32.

Noel, K.D., Duelli, D.M., Tao, H., and Brewin, N.J. (1996). Antigenic change in the lipopolysaccharide of *Rhizobium etli* CFN42 induced by exudates of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 9, 180-186.

Parniske, M., Fischer, H.M., and Werner, D. (1991). Accumulation of the phytoalexin glyceollin I in soybean nodules infected by a *Bradyrhizobium japonicum nifA* mutant. J. Bioscience 46, 318-320.

Parniske, M., Schmidt, P.E., Kosch, K., and Müller, P. (1994). Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 7, 631-638.

Pavelka, M.S., Jr., Hayes, S.F., and Silver, R.P. (1994). Characterization of KpsT, the ATP-binding component of the ABC-transporter involved with the export of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. J. Biol. Chem. 269, 20149-20158.

Pavelka, M.S., Jr., Wright, L.F., and Silver, R.P. (1991). Identification of two genes, *kpsM* and *kpsT*, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. J. Bacteriol. 173, 4603-4610.

Pazzani, C., Rosenow, C., Boulnois, G.J., Bronner, D., Jann, K., and Roberts, I.S. (1993). Molecular analysis of region 1 of the *Escherichia coli* K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide. J. Bacteriol. 175, 5978-5983.

Perotto, S., Brewin, N.J., and Kannenberg, E.L. (1994). Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. Mol. Plant-Microbe Interact. 7, 99-112.

Persson, B., Krook, M., and Jornvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. Eur. J. Biochem. 200, 537-543.

Petit, C., Rigg, G.P., Pazzani, C., Smith, A., Sieberth, V., Stevens, M., Boulnois, G., Jann, K., and Roberts, I.S. (1995). Region 2 of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster encoding proteins for the biosynthesis of the K5 polysaccharide. Mol. Microbiol. 17, 611-620.

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

Phillips, D.A., Dakora, F.D., Leon-Barrios, M., Sande, E., and Joseph, C.M. (1993). Signals released from alfalfa regulate microbial activities in the rhizosphere. In New Horizons in Nitrogen Fixation. (Dordrecht: Kluwer), pp. 197-202.

Phillips, D.A. and Kapulnik, Y. (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. Trends. Microbiol. 3, 58-64.

Powell, R. and Gannon, F. (1988). The leghaemoglobins. BioEssays 9, 117-121

Priefer, U.B. (1989). Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* VF39. J. Bacteriol. 171, 6161-6168

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

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

Reuhs, B.L., Carlson, R.W., and Kim, J.S. (1993). *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2- octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175, 3570-3580.

Reuhs, B.L., Williams, M.N., Kim, J.S., Carlson, R.W., and Cote, F. (1995). Suppression of the Fix- phenotype of *Rhizobium meliloti exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. J. Bacteriol. 177, 4289-4296.

Reuhs, B.L., Geller, D.P., Kim, J.S., and, J.E.F., and Pueppke, S.G. (1996). Structural conservation in the cell associated polysaccharides of *Rhizobium* sp. NGR234, *R. fredii*, and *R. meliloti*. Submitted to App. Environ. Microbiol.

Reuhs, B.L., Kim, J.S., and Matthysse, A.G. (1997). Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. J. Bacteriol. 179, 5372-5379.

Rietschel ET, (ed) (1985). Handbook of Endotoxines vol.1.Elsevier Science publishers, Amsterdam.

Rimokh, R., Gadoux, M., Bertheas, M.F., Berger, F., Garoscio, M., Deleage, G., Germain, D., and Magaud, J.P. (1993). FVT-1, a novel human transcription unit affected by variant translocation t(2;18)(p11;q21) of follicular lymphoma. Blood 81, 136-142.

Roberts, I.S., Mountford, R., Hodge, R., Jann, K.B., and Boulnois, G.J. (1988). Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 1305-1310.

Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. of Microbiol. 50, 285-315.

Rolfe, B.G. (1988). Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. Biofactors 1, 3-10.

Rosenow, C., Esumeh, F., Roberts, I.S., and Jann, K. (1995). Characterization and localization of the KpsE protein of *Escherichia coli* K5, which is involved in polysaccharide export. J. Bacteriol. 177, 1137-1143.

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

Russo, T.A., Wenderoth, S., Carlino, U.B., Merrick, J.M., and Lesse, A.J. (1998). Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes *kpsD*, *kpsM*, *kpsT*, and *kpsE* from an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). J. Bacteriol. 180, 338-349.

Saier, M.H., Jr. (1994). Convergence and divergence in the evolution of transport proteins. BioEssays 16, 23-29.

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Sau, S., Bhasin, N., Wann, E.R., Lee, J.C., Foster, T.J., and Lee, C.Y. (1997). The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. Microbiol. 143, 2395-2405.

Savoure, A., Sallaud, C., El-Turk, J., Zuanazzi, J., Ratet, P., Schultze, M., Kondorosi, A., Esnault, R., and Kondorosi, E. (1997). Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. Plant J. 11, 277-287.

Scheres, B., Van de Wiel, C., Zalensky, A., Horváth, B., Spaink, H., Van Eck, H., Zwartkruis, F., Volters, A-M., Gloudemans, T., van Kammen, A., Bisseling, T. (1990a). The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. Cell 60:281-294.

Scheres, B., Van Engelen, F., Van der Knaap, E., Van de Wiel, C., Van Kammen, A., and Bisseling, T. (1990b). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. Plant Cell 2, 687-700.

Schultze, M., Kondorosi, A., Ratet, P., Buire, M., and Kondorosi, E. (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. Int. Rev. Cytol. 156, 1-75.

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

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

Silver, R.P., Aaronson, W., and Vann, W.F. (1987). Translocation of capsular polysaccharides in pathogenic strains of *Escherichia coli* requires a 60-kilodalton periplasmic protein. J. Bacteriol. 169, 5489-5495.

Sindhu, S.S., Brewin, N.J., and Kannenberg, E.J. (1990). Immunochemical analysis of lipopolysaccharides from free-living and endosymbiotic forms of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 172, 1804-1813.

Smit, G., Kijne, J.W., and Lugtenberg, B.J.J. (1986). Correlation between extracellular fibrils and attachement of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. 168, 821-827.

Smit, G., Kijne, J.W., and Lugtenberg, J.J. (1987). Both cellulose fibrils and Ca^{2+}-dependent adhesin are involved in the attachement of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. 169, 4294-4301.

Smith, A.N., Boulnois, G.J., and Roberts, I.S. (1990). Molecular analysis of the *Escherichia coli* K5 kps locus: identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system. Mol. Microbiol. 1863-1869.

Stacey, G., So, J.-S., and Carlson, R.W. (1991). A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. Mol. Plant-Microbe Interact. 4, 332-340.

Stevenson, G., Kessler, A., and Reeves, P.R. (1995). A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. FEMS Microbiol. Lett. 125, 23-30.

Sutherland, I.W. (1985). Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial exracellular and wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 39, 243-270.

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

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., De Billy, F., Promé, J.C., and Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature 351, 670-673.

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

Tsai, C., and Frasch, C.E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 119, 115-119.

Urzainqui, A. and Walker, G.C. (1992). Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti exo* mutants. J. Bacteriol. 174, 3403-3406.

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

Vasse, J., De Billy, F., and Truchet, G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. Plant J. 4, 555-566.

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

Vazquez, M., Santana, O., and Quinto, C. (1993). The NodL and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from Gram- negative bacteria. Mol. Microbiol. 8, 369-377.

Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. Trends. Microbiol. 178-185.

Whitfield, C. and Valvano, M.A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 35, 136-245.

Williams, M.N., Hollingsworth, R.I., Brzoska, P.M., and Signer, E.R. (1990). *Rhizobium meliloti* chromosomal loci required for suppression of exopolysaccharide mutations by lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 172, 6596-6598.

Williams, M.N., Hollingsworth, R.I., Klein, S., and Signer, E.R. (1990). The symbiotic defect of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lpsZ*$^+$, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. J. Bacteriol. 172, 2622-2632.

Wunder, D.E., Aaronson, W., Hayes, S.F., Bliss, J.M., and Silver, R.P. (1994). Nucleotide sequence and mutational analysis of the gene encoding KpsD, a periplasmic protein involved in transport of polysialic acid in *Escherichia coli* K1. J. Bacteriol. 176, 4025-4033.

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

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

York, G.M. and Walker, G.C. (1997). The *Rhizobium meliloti exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. Mol. Microbiol. 25, 117-134.

Zapata, G., Crowley, J.M., and Vann, W.F. (1992). Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. J. Bacteriol. 174, 315-319.