

**Ph.D. értekezés tézisei**

***A Sinorhizobium meliloti ntrPR operonjának  
funkciója és szabályozása***

**Készítette: Monica Bodogai**

**Témavezető: Dr. Dusha Ilona**

**MTA Szegedi Biológiai Központ**

**Genetikai Intézet**

**Szegedi Tudományegyetem**

**2007**

## Bevezetés

A közelmúltban nagyszámú prokarióta genom teljes DNS szekvenciája vált ismertté, és az eredmények feldolgozása a mikrobiális DNS és fehérje adatbázisok gyors növekedését eredményezte. Az így felhalmozódott adattömeg elősegítette a baktériumok kromoszómáján és plazmidjain jelenlévő nagyszámú toxin-antitoxin (TA) modul azonosítását is.

Az első TA modulokat, mint plazmidokon működő poszt-szegregációs elimináló rendszereket írták le. Ezek funkciója a plazmid nélküli utódsejtek elszaporodásának megakadályozása. Ezt követően kromoszómális TA lókuszokat is azonosítottak, melyek feladata különböző stresszhatásokat követően a transzláció általános szintjének modulálása. A tipikus TA modul két kisméretű génből álló operon, melyben az első gén egy instabil antitoxint, a második gén pedig egy stabil toxin fehérjét határoz meg. A két fehérje komplexet képez, így akadályozza meg az antitoxin a toxin letális hatását. Stressz körülmények között az antitoxint különböző

proteázok elbontják, ekképpen a szabad toxin aktivitásának hatására a transzláció gátlása következik be.

Hét TA géncsaládot írtak le, melyek közül a legnépesebb a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokban, valamint az Archaeakban is jelenlévő *vapBC* család. Ebben a családban az antitoxin fehérje az AbrB/MazE fehérjékkel, a toxin partner pedig a PIN doménnel mutat homológiát.

A *Sinorhizobium meliloti*ban korábban azonosított *ntrPR* operonról kimutattuk, hogy szerveződése és az általa kódolt fehérjék domén struktúrája a *vapBC* családhoz tartozó TA modulokéval megegyezik. Az *ntrR* génben lévő Tn5 inszerció a gümőképzési és nitrogénkötési gének megnövekedett transzkripcióját okozta a szimbiózis körülményei között, és ez a hatás külső ammóniumforrás jelenlétében még fokozottabb volt. Ezért azt feltételeztük, hogy az NtrR fehérjének a *nod* és *nif* gének nitrogénszabályozásában van szerepe. Azonban a vad típusú és az *ntrR* mutáns törzs teljes genomjának génexpressziós mintázatát összehasonlítva azt az eredményt kaptuk, hogy a mutáns törzsben meglepően

nagy számú gén mutatott megváltozott expressziós szintet, mely arra utalt, hogy az NtrR fehérjének általánosabb funkciója lehet.

## **Célkitűzés**

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az NtrP és NtrR fehérje autoregulációs tulajdonsága, komplex képzése és funkciója alapján aktív TA rendszert képvisel-e, továbbá, hogy meghatározzuk ennek az operonnak a lehetséges fiziológiai szerepét *Sinorhizobium meliloti*ban.

## **Eredmények**

Az NtrPR fehérjék autoregulációban játszott szerepét különböző módszerekkel vizsgáltuk: mértük az *ntrPR* promóter aktivitását, valamint a fehérje-DNS kölcsönhatás meghatározására elektroforetikus mobilitás változást detektáló és DNázi „footprint” méréseket végeztünk.

Kimutattuk, hogy az *ntrPR* operon a bakteriális toxin-antitoxin modulok jellegzetes regulációs tulajdonságaival

rendelkezik, az NtrP antitoxin felismer egy DNS szakaszt az *ntrPR* operon promóter régiójában, de a kötődése gyenge. A toxin komponens önmagában nem képes kötődni ehhez a DNS régióhoz, de az NtrP és NtrR komplexe erősen kötődik a promóterhez, így a komplex negatív autoregulációt idéz elő. Az NtrP N-terminális fele felelős a promóter DNS-sel való kölcsönhatásért, míg a C-terminális rész a fehérje-fehérje kölcsönhatáshoz szükséges.

Az NtrR toxicitásának vizsgálata bizonyította, hogy ennek a fehérjének az expressziója a sejtnövekedés és a telepképzés gátlását okozza.

Megvizsgáltuk az *ntrPR* modul indukcióját *Sinorhizobium meliloti*-ban. A *mazEF* TA család inducerének, a ppGpp-nek nem volt hatása az *ntrPR* operonra, míg a transzkripciót vagy a transzlációt gátló antibiotikumok gyengén befolyásolták a modul expresszióját.

Ha a toxin-antitoxin modulok stressz hatására működésbe lépő modulátorként játszanak szerepet, akkor a *Sinorhizobium meliloti* igen hasznos teszt organizmus

lehet a hasonló rendszerek megismerésében. Ennek a szimbiotikus nitrogénkötő baktériumnak a metabolizmusát ugyanis igen sokféle külső tényező befolyásolhatja, melyeket képes tolerálni és túlélni: megtalálható szabadon élő állapotban a talajban, vagy a pillangós növények gyökerén fejlődő gümőkben, életképes aerob körülmények között, de a baktérium differenciálódott formájában bakteroidként funkcióképes alacsony oxigén koncentrációk mellett is. Egy másik jellegzetes tulajdonsága a *Sinorhizobium melilotinak*, hogy szimbiotikus állapotban speciális metabolizmussal rendelkezik: a nitrogénkötéshez energiát biztosító dikarbonsavakat, melyek a bakteroidok által felhasznált szénforrások, a növény metabolizmusa biztosítja, míg cserébe, a kötött nitrogén a bakteroidokból a növényi sejtekbe szállítódik, és a bakteroidok ammónium asszimilációs rendszere inaktív.

A baktérium kromoszómális toxin-antitoxin rendszereinek fontos szerepe lehet az egyik életformából a

másikba való átmenet során, és meghatározhatják a változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodást.

A korábbi kísérletek, melyekben kimutattuk a *nod*, *nif* és *fix* gének megnövekedett expresszióját az *ntrR* mutánsban szimbiótikus körülmények között, valamint a nagyarányú transzkripciós változások a baktérium genomjában mind arra utalnak, hogy az *ntrPR* operon segíthet a baktérium sejteknek azokban a metabolizmust érintő változásokban, melyeket a szabadon élő állapotból a szimbiótikus állapotba való átmenet indukál, hiszen ez az átmenet jelentős metabolikus átalakulásokkal jár.

Fehérje homológia, domén felépítés és génszomszédság analízis alapján a *Sinorhizobium meliloti* 1021 törzs genomjában 17 TA modult azonosítottunk, melyek különböző géncsaládokhoz tartoznak. A 17 modulból 10 a *vapBC* géncsalád tagja, és ezek mindegyike a baktérium kromoszómáján helyezkedik el. Vajon mi lehet az oka, hogy ilyen nagy számú *vapBC* modul van a genomban, és miért csak a kromoszóma hordoz teljes modulokat, míg a plazmidokon csak magányos és valószínűleg inaktív toxin gének találhatók? Figyelembe

véve ezeknek a moduloknak a stresszkezelésben betöltött lehetséges fiziológiai szerepét, nagy számban való előfordulásuk a *Sinorhizobium meliloti* genomjában talán nem meglepő. A TA rendszerek segíthetnek a baktériumnak a különböző metabolikus átmenetek kezelésében.

Eredményeinket összefoglalva, kísérleteinkben jellemeztük az első, szimbiótikus baktériumban jelenlévő TA modult. Továbbá, az AbrB/SpoVT domént tartalmazó fehérjék DNS kötő képességét meghatározva új információt nyertünk a *vapBC* géncsaládról. Adataink, melyek az *ntrPR* modul szerepét mutatják a szimbiótikus állapothoz való alkalmazkodásban, új perspektívát tárnak fel arról, hogy a *Rhizobiumok* miként alkalmazkodnak metabolikus folyamataikkal a változó környezeti követelményekhez.



## Közlemények jegyzéke

**Bodogai M**, Ferenczi S, Bashtovyy D, Miclea P, Papp P, Dusha I., The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. Mol Plant Microbe Interact. 2006 Jul;19(7):811-22.

Puskas LG, Nagy ZB, Kelemen JZ, Ruberg S, **Bodogai M**, Becker A, Dusha I. Wide-range transcriptional modulating effect of *ntrR* under microaerobiosis in *Sinorhizobium meliloti*. Mol Genet Genomics. 2004 Oct;272(3):275-89

**Bodogai M.**, Ferenczi Sz., Miclea S.P., Papp P., Dusha I.: Toxin-antitoxin modules and symbiosis, Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Nitrogen Fixation, Capetown, South Africa, January 2007 (in publication)

## Nyilatkozat

Monica Bodogai a „The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module” (Mol Plant Microbe Interact. 19(7):811-22) és “Wide-range transcriptional modulating effect of *ntrR* under microaerobiosis in *Sinorhizobium meliloti*” (Mol Genet Genomics 272(3):275-89) című közleményeiben ismertetett eredményeivel jelentős mértékben hozzájárult az említett publikációk létrejöttéhez. Ezért, mint a fenti cikkek felelős szerzője, támogatom azt, hogy e publikációkat doktori fokozatszerzéséhez felhasználja.

Szeged,  
2007, február 22

Dr. Dusha Ilona  
tudományos tanácsadó

.....

## Egyéb közlemények

### **Poszterek**

**Bodogai, M.**, Cinege, Gy., Dusha, I., 2003: The regulatory cascade of *nif*-fix genes is under the control of *ntrR* in *Sinorhizobium meliloti*, The 5<sup>th</sup> Hungarian Genetic Congress, Siofok, 2003

**Bodogai M.**, Puskás L.G., Nagy Zs.B., Kelemen J.Zs., Rüberg S., Becker A., Dusha I., 2004: Wide-range transcriptional modulating effect of *ntrR* under microaerobiosis in *Sinorhizobium*, The 6<sup>th</sup> European Conference on Nitrogen Fixation, 2004

**Bodogai M.**, Miclea S. P., Becker A., Puskas L., Dusha I.: Az *ntrR* gén transzkripció szintet moduláló hatása *Sinorhizobium meliloti*-ben, The 6<sup>th</sup> Hungarian Cell and Development Biology Congress, Eger, Hungary, 2005

**Bodogai M.**, Ferenczi Sz., Miclea S.P., Papp P., Dusha I.: A toxin-antitoxin module in *Sinorhizobium meliloti*, 7<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference. Aarhus, Denmark, 2006

## Előadások

**Bodogai M.**, Ferenczi Sz., Miclea P., Papp P., Dusha I.: The *ntrPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module, Straub-days, Szeged, Hungary, 2005

**Bodogai M.**, Ferenczi Sz., Miclea S.P., Papp P., Dusha I.: A toxin-antitoxin module in *Sinorhizobium meliloti*, 7<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference. Aarhus, Denmark, 2006

**Bodogai M.**, Ferenczi Sz., Miclea S.P., Papp P., Dusha I.: Toxin-antitoxin modules and symbiosis, 15<sup>th</sup> International Conference on Nitrogen Fixation, Capetown, South Africa, January 2007