

Bakteriális gének szerepe a szimbiotikus gümő inváziójában

(2002. – 2005.)

témavezető: Dr.Putnoky Péter

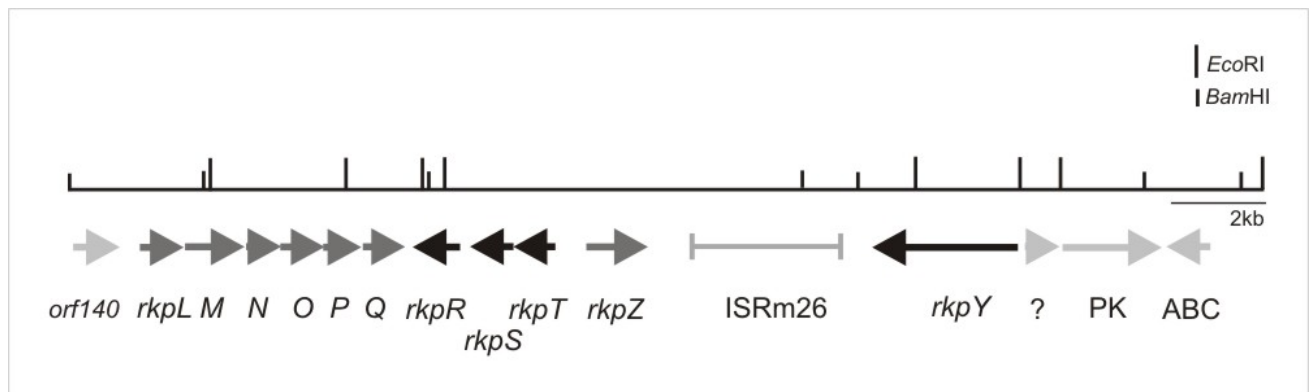
Munkánk hosszú távú célja, hogy megismerjük a szimbiotikus gümő inváziójában szerepet játszó bakteriális géneket és ezen gének szerkezetének, funkciójának és szabályozásának ismeretében megértsük, hogy milyen mechanizmusok révén képes egy baktérium (*Sinorhizobium meliloti*) bejutni a gazdanövény (lucerna – *Medicago sativa*) sejtjeibe.

E célok elérése érdekében azonosítottunk számos olyan bakteriális mutációt, melyek a fertőzési folyamatot megakadályozták (infekcióban hibás, Inf⁻ fenotípus), majd a mutánsok segítségével izoláltuk a folyamatban szerepet játszó géneket. E gének szerkezetének és funkciójának elemzése révén sikerült a későbbiekben elsőként bizonyítékot szolgáltatni arra, hogy a kapszuláris poliszacharidnak (KPS) — hasonlóan az exopoliszacharidhoz — szerepe lehet az invázió folyamán, valamint leírtunk egy új géncsoportot (*phaABCDEFGF* gének), melynek a növény belsejében lévő viszonyokhoz való alkalmazkodásban van szerepe. Feltételezésünk szerint a *pha* géncsoport egy K⁺/H⁺ antiportert kódol, amelynek funkciója feltehetően a sejtek belső pH-értékének szabályozása. A pályázat keretében célul tűztük ki a kapszuláris poliszacharid bioszintézisében fontos *rkp* gének és az általuk kódolt fehérjék szerepének pontosabb megértését, valamint a *pha* gének szerepének további tisztázását.

1. Az *rkp* gének elemzése

1.1. A teljes *rkp-3* régió szekvenciájának meghatározása

Korábbi eredményeink szerint a *S. meliloti* 41 baktérium *rkp* génjeinek a K_{R5} antigénnek nevezett kapszuláris poliszacharid bioszintézisében van szerepe. E poliszacharid szerepet játszik mind a szimbiotikus gümő inváziójában, mind pedig a 16-3 bakteriofág fertőzési folyamatában. Az *rkp-3* régió főleg törzsspecifikus géneket tartalmaz, melyek más *S. meliloti* törzsekben nem találhatóak meg. Az itt elhelyezkedő *rkpL* – *rkpZ* géneket kódoló DNS-szakasz elemzését már a pályázat beadása előtt elvégeztük, azonban a régió jobb oldalának, az *rkpY* gén környékének, szekvenenciaanalízise még nem volt kész (1. ábra).



1. ábra: Az *rkp-3* régió génjei (magyarázat a szövegben)

Ez további 12 kb hosszúságú szakasz meghatározását jelentette, amin belül csak az *rkpY* gén mutáns fenotípusát ismertük (lásd 1.3. fejezet). A többi feltételezett génről csak a bioinformatikai elemzések nyújtottak némi információt. Ezek alapján a régióban található egy inszerciós szekvencia (IS_{Rm26}), valamint egy protein kinázt (PK) és egy ABC-transzportert (ABC) kódoló nyitott leolvasási keret. (1. ábra). E régió genetikai elemzéséről a későbbi fejezetekben lesz szó.

1.2. Az RkpM fehérje a 16-3 fág receptorának alkotója

Eredményeinknek az 1.2.1.-1.2.5. fejezetekben összefoglalt részét már publikáltuk (*J Bacteriol* **186**:1591-1597).

Munkánk során szerettük volna tovább pontosítani ismereteinket a K_{R5} antigén szimbiózisban betöltött szerepét illetően. Arra voltunk kíváncsiak, hogy létezik-e olyan funkcionális molekularészlet, bioszintézisben bekövetkező utólagos módosítás, melynek hiányában a szimbiózis az infekciós lépésben elakad. Erre kísérletes bizonyíték néhány rhizobium törzs exopoliszacharid (EPS) termelésért felelős géneinek esetében már van. A kapszuláris poliszacharid szerkezetének gazdaspecifikus vonatkozásait olyan feltételezett mutáns baktériumtörzsek izolálása révén szerettük volna megismerni, amelyek felszínén a K_{R5} antigén módosult változatban van jelen. Ezen fenotípust okozó genetikai mutáció(k) helyének pontos behatárolásával a feltételezett gazdaspecifitásért felelős gén(ek) meghatározható(k), és esetleg a bioszintézisben részt vevő ismeretlen gének azonosítására is lehetőség nyílhat.

1.2.1. Spontán fágreceptorhibás baktériumtörzsek izolálása

Első célunk olyan baktériummutánsok izolálása volt, amelyek felszínén módosult szerkezetű K_{R5} antigén van jelen. Mivel feltételeztük, hogy a K_{R5} antigén egyúttal receptorként szolgál a 16-3 fág számára, a bakteriofágot alkalmaztuk szelekciós eszközként. Ebben az esetben azonban nem egyszerűen a fágra rezisztens mutánsokat kerestünk, hanem olyanokat, amelyeken host range fágmutánsokat is lehet izolálni. Ez a fenotípus azt jelenti, hogy a baktériummutáns felszínén a fágreceptor módosult formában van jelen, és a fágpopulációban előforduló spontán mutánsok között található olyan egyedek, amelyek képesek felismerni ezt a módosult receptort.

Egy ilyen mutációt sikerült is találnunk körülbelül 100 függetlenül izolált fágrezisztens mutáns baktérium átvizsgálása során. Ezt GH4046 törzsnek, míg az általa hordozott mutáns allélt *rkp-4046* lokusznak neveztük el, gyanítván, hogy az *rkp* gének valamelyike sérült a mutánsban. A GH4046 törzsön izolált host range fág (16-3 *h5*) oldalán is elindult a jelenség vizsgálata (1.2.5 fejezet).

1.2.2. A receptormutáció az *rkp-3* régió bal oldalán található

A mutáns gén azonosításához első lépésben meg kellett állapítanunk, hogy az *rkp-4046* mutáció eddig még nem azonosított, vagy már ismert *rkp* gént érint-e. Ennek eldöntésére genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. A GH4046 törzsbe egyenként bejuttattuk az *rkp-1* (pPP428), *rkp-2* (pAT330), *rkp-3* (pAT399, pAT401) régiókat hordozó kozmidklónokat. A fágérzékenység helyreállítását vad típusú 16-3 fággal teszteltük. Az *rkp-1* és *rkp-2* régiók bejuttatásával nem tudtuk helyreállítani a vad fenotípust. A teljes *rkp-3* régiót két átfedő kozmid klón tartalmazta, mivel a régió több mint 50 kb kiterjedésű. Ezek közül a pAT401 nem, míg a pAT399 képes volt a fágérzékenység helyreállítására, tehát az *rkp-4046* mutáció az *rkp-3* régió belül, annak bal oldali szakaszán található.

1.2.3. Az *rkp-4046* az *rkpM* gén mutáns allélja

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az *rkp-3* régió belül melyik gén allélja az *rkp-4046*. Újabb komplementációs kísérletek során olyan kozmidklónokat juttattunk be a GH4046 törzsbe, amelyek ismert helyzetű Tn5 transzpozon inszerciót hordoztak egy-egy *rkp* génben. Ha a bejuttatott kozmid klónban a transzpozon nem ugyanazt a gént érinti, mint a GH4046 törzsben lévő *rkp-4046* mutáció, akkor minden bioszintézisgén legalább egy, hibátlan kópiája jelen van a sejtben, vagyis komplementáció történhet, a K_R5 antigén bioszintézise helyreáll. A Tn5 inszerció esetleges poláris hatása befolyásolhatja az eredményeket. A komplementáció hiányát vagy megtörténtét ismét fágteszt segítségével állapítottuk meg. Eredményeink szerint csak a pAT399 *rkpM::Tn5* klón nem tudta helyreállítani a vad fenotípust, ami azt jelenti, hogy a GH4046 baktériumtörzs az *rkpM* egy mutáns allélját hordozza. Ezt *rkpM4046* allélnak neveztük el.

Poliakrilamid-gélelektroforézis (DOC-PAGE) segítségével kimutattuk, hogy a GH4046 törzs egyáltalán nem termel kapszuláris poliszacharidot. Ebből a szempontból pontosan úgy viselkedik, mint az előzőleg már jellemzett *rkpM::Tn5* mutáns. Viszont a Tn5 inszerciót hordozó mutáns host-range fág nem izolálható, azaz ennek felszínéről a receptort alkotó struktúra feltehetően eltűnt, vagy jelentősen megváltozott.

Mindez arra utal, hogy — kezdeti feltételezésünkkel ellentétben — a *I6-3* fág receptora valószínűleg nem a K_R5 antigén. A receptor alkotóeleme, az RkpM fehérje és az *rkpM4046* allél egy különleges mutációt hordoz, amely egy megváltozott szerkezetű fágreceptort eredményez.

1.2.4. Az *rkpM4046* allélban egy missense mutáció található

Az *rkpM* gén pontos bázissorrendjét már meghatároztuk, ami lehetővé tette a mutáns allél izolálásához (PCR), illetve szekvenálásához szükséges oligonukleotidok megtervezését. Kimutattuk, hogy az *rkpM4046* mutáns és az *rkpM41* vad típusú allél között csak egy eltérés van, a gén 3' végének közelében: a vad típusú allél leucint (L₂₅₂) meghatározó TTG kodonja fenil-alanint (P₂₅₂) jelentő TTC kodonná változott.

1.2.5. A *I6-3* fág *h5* host range mutációja aminosavcserét okoz.

A fágreceptor mutáns GH4046 baktériumon a vad típusú fágpopuláció egy töredéke (kb. 50 10⁸ fág közül) "visszanyerte" fertőzőképességét. Feltételeztük, hogy ezek a fágok egy host-range mutációt hordoznak a farki rostot meghatározó *h* génben, és ez teszi lehetővé a megváltozott RkpM4046 receptorfehérje felismerését. Mivel a fág *h* génjének szekvenciája még nem volt ismert, csak körülbelüli helyzete a fág fizikai-genetikai térképén, ezért először a vad típusú allél bázissorrendjét határoztuk meg.

Ezek után láttunk neki két mutáns allél (*h5*, *h15*) pontos szerkezetének felderítéséhez. Mindkét allél esetében pontosan ugyanolyan missense mutációt találtunk a feltételezett H fehérjét kódoló régióban. Ahol a vad típusú fág esetében GGC, azaz glicint kódoló triplet volt, ott a mutánsokban GAC kodont találtunk, ami aszparaginsavat határoz meg.

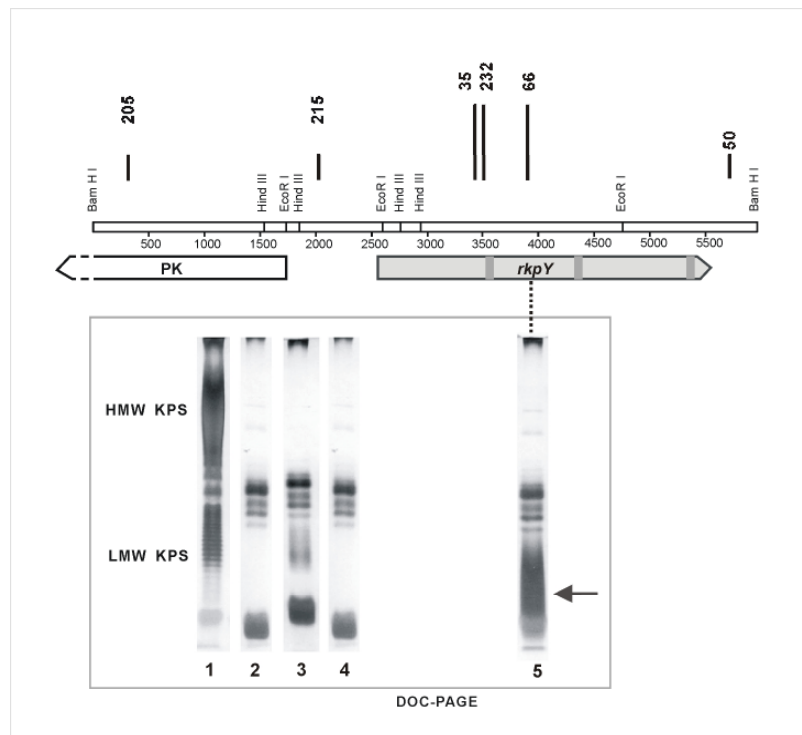
A *h5*, *h15* allélokban lévő missense mutáció bizonyítja, hogy a feltételezett *h* gén által kódolt fehérje szerepet játszik a fágreceptor felismerésében. Az aminosavcsere helye arra utal, hogy a kódolt fehérje C-terminális része fontos szerepet tölt be ebben a folyamatban.

1.3. Az *rkpY* gén két különböző poliszacharid bioszintézisét befolyásolja

Az *rkp-3* régió jobb oldalán Tn5 inszerciót tartalmazó mutánsok egy, csak rájuk jellemző, viszonylag kis lánchosszúságú poliszacharidot termelnek (2. ábra), szimbiózisban képtelenek a növény inváziójára és rezisztensek a *I6-3* bakteriofágra. A mutánsok által létrehozott poliszacharidról feltételeztük, hogy az a K_R5 antigén prekuzora. Célul tűztük ki a mutációk által érintett gén(ek) megismerését és a termelt KPS jellemzését.

1.3.1. Az *rkpY* gén egy új típusú fehérjét kódol

Meghatároztuk a mutáns fenotípust eredményező Tn5(35), Tn5(66) és Tn5(232) transzpozon inszerciók pontos beépülési helyét. Az érintett régióban egyetlen, az átlagosnál jóval hosszabb, nyitott leolvasási keretet találtunk, amelyet *rkpY* génnek neveztünk el (2. ábra). A gén 1011 aminosavból álló, feltételezett terméke nem mutat hasonlóságot semmilyen adatbázisban lévő fehérje szekvenciával, nem hordoz ismert domént vagy motívumot. Egyedüli jellegzetessége, hogy — feltételezhetően — 2 vagy 3 transzmembrán domént tartalmaz, néhány predikcióra alkalmas program értékelése szerint.



2. ábra: Az *rkpY* gén szerkezete és a mutánsok poliszacharid termelése

felül: A régió fizikai térképe, a K_R5 antigén termelését és inváziós képességét érintő Tn5 inszerciókat hosszú függőleges vonal jelzi. A meghatározott szekvencián az *rkpY* gént jelentő ORF mellett még egy másik, feltételezett kódoló régió eleje is megtalálható (PK), amelynek feltételezett terméke proteinkinázokkal mutat hasonlóságot. Ez utóbbi gént érintő Tn5(205) inszercióknak, illetve a régióban izolált Tn5(215) és Tn5(50) inszercióknak a baktériumok növekedésére, szimbiotikus képességére vagy poliszacharidtermelésére semmilyen hatását nem észleltük.

alul: A DOC-PAGE géleképek: (1) kontroll, vad típusú KPS (AK631), (2) *rkpL*::Tn5(187), (3) *rkpO*::Tn5(158), (4) *rkpQ*::Tn5(121) (5) *rkpY*::Tn5(66). A nyíl az *rkpY* mutánsokra jellemző poliszacharidsávra mutat. LMW/HMW: kis/nagy molekulatömegű KPS.

1.3.2. Az *rkpY* mutáns által termelt poliszacharid nem prekuzora a K_R5 antigénnek

Ha az *rkpY* mutáns által termelt poliszacharid a K_R5 antigén bioszintézisének valamiféle köztes terméke, akkor a K_R5 antigén bioszintézisét egyértelműen gátló mutációknak ennek a kisebb molekulatömegű poliszacharidnak a termelését is meg kell akadályoznia. A kérdést kettős *rkp* mutánsok létrehozásával meg lehet válaszolni.

E mutánsok létrehozásához egy *rkpY* spontán mutációt használtunk fel. A 16-3 fág segítségével szelektált fágrezisztens baktériumokat előbb az általuk termelt poliszacharid vizsgálatával jellemeztük (DOC-PAGE), és kiválasztottuk azokat, amelyek az *rkpY::Tn5* mutánsokhoz hasonló, egyedi poliszacharid mintázatot mutattak (2. ábra). Az *rkpY* gént hordozó *Bam*HI fragment bejuttatásával a kiválasztott mutánsok esetében helyreállítható volt a vad típusú K_R5 antigén termelése. Ezzel bizonyítottuk, hogy ezek a mutánsok valóban az *rkpY* génben sérültek. A kettős *rkp* mutánsok létrehozásához az *rkpY3222* allélt hordozó NE3222 törzset használtuk.

Az *rkpY3222* mutáció mellé, homológ rekombináció segítségével, külön-külön bejuttattunk olyan Tn5 inszerciókat, amelyek az *rkp-1*, *rkp-2* és *rkp-3* régiók reprezentáns génjeit érintették. E mutációk helyzetét korábbi munkáink révén már szekvenciaszinten is meghatároztuk, tehát pontosan tudtuk, hogy mely géneket érintik. A kettős mutánsok létrehozása után DOC-PAGE segítségével jellemeztük az általuk termelt poliszacharidokat. Eredményeinket a 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Az *rkp* kettős mutánsok poliszacharid termelése

törzs	genotípus	termelt KPS
3222	<i>rkpY3222</i>	<i>rkpY</i>
4141	<i>rkpY3222</i> + <i>kpA::Tn5</i> (666)	<i>rkpY</i>
4140	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpB::Tn5</i> (665)	<i>rkpY</i>
4139	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpC::Tn5</i> (644)	<i>rkpY</i>
4199	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpK::Tn5</i> (207)	<i>rkpY</i>
4201	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpL::Tn5</i> (187)	<i>rkpY</i>
4202	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpM::Tn5</i> (212)	<i>rkpY</i>
4200	<i>rkpY3222</i> + <i>rkpQ::Tn5</i> (124)	<i>rkpY</i>

Az *rkpA*, *rkpC*, *rkpB*, *rkpK*, *rkpL*, *rkpM*, *rkpQ* gének mutációi a dupla mutánsokétól teljesen különböző, általában poliszacharidot nem-termelő fenotípust eredményeztek.

Látható, hogy a második *rkp* mutációnak nincs hatása az *rkpY3222* allél fenotípusára — nem tűnik el a kisebb molekulatömegű poliszacharid —, tehát valószínű, hogy a két bioszintézisút, az *rkpY* gén kivételével, nem tartalmaz közös elemet.

1.3.3. Az *rkpY* mutánsok egy Kdo-homopolimert termelnek

A genetikai kísérletek nem támasztották alá, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt poliszacharid a K_R5 antigén prekuzora. A cukorkémiai vizsgálatok hasonló eredményre vezettek. Az *rkpY* mutáns baktériumból származó poliszacharidot Dr. Bradley L. Reuhs, laboratóriumában elemezték (Whistler Center for Carbohydrate Research, Purdue University, West Lafayette, IN). A mutánsok által termelt poliszacharid és a K_R5 antigén 1D NMR spektruma jelentősen eltért egymástól, ami bizonyítja, hogy a két tisztított poliszacharidot nem azonos építőkövek alkotják. Az elemzések szerint a K_R5 antigén diszacharid egységekből áll (GlcA és Pse5NAc7N(β-OH-But), az *rkpY* mutánsok pedig egy homopolimert termelnek, amely

3-deoxi-D-manno-oktulozonsav (Kdo) egységekből épülő fel (Kdo-PS). A 2D NMR analízis eredménye szerint a polimer a következőképpen írható fel:



Ez a szerkezet, a K_{R5} antigénnel együtt, sok hasonlóságot mutat az *Escherichia coli* kettes csoportba tartozó K-antigénjeivel.

1.3.4. Az *rkpR* a Kdo-PS bioszintézisében vesz részt

Mivel az *rkpR* és *rkpST* gének közvetlenül az *rkpLMNOPQ* gének mellett helyezkednek el (1. ábra), és termékük a KPS-transzportfehérjéhez hasonló, feltételeztük, hogy a K_{R5} antigén transzportjában van szerepük. Ezt azonban a korábban létrehozott mutánsok fenotípusa nem igazolta, mivel az inszerciók nem gátolták a K_{R5} antigén bioszintézisét. Az *rkpR* génnek nevezett szakaszon sikerült aktív *phoA* transzlációs fúziót izolálnunk (Tn*phoA*), amely bizonyította, hogy az *rkpR* egy membránfehérjét kódoló, működő gén. Az 1.3.2. fejezetben leírt kísérletek után kézenfekvő volt, hogy megvizsgáljuk az *rkpR* gén szerepét a Kdo-PS bioszintézisében. A létrehozott *rkpR* / *rkpY* kettős mutáns nem volt képes a Kdo-homopolimer termelésére, ezért feltehető, hogy az RkpR és valószínű, hogy az RkpS és RkpT fehérjék is ennek a polimernek a transzportjában nélkülözhetetlenek.

A régióban található többi gén (ABC, PK – 1. ábra) szerepét hasonló módon szeretnénk tisztázni, mielőtt eredményeinket publikáljuk. Ez feltehetően egy éven belül megtörténik.

1.4. Egyes Rkp fehérjék funkciójának biokémiai vizsgálata és az *rkp* gének regulációja

Az *rkpK* és *lpsL* gének termékeiről, főleg bioinformatikai elemzés révén, feltételezzük, hogy az UDP-glükóz átalakítását végzik. Az RkpK egy feltételezett UDP-glükóz-dehidrogenáz, amely oxidálja az UDP-glükózt UDP-glükuronsavvá, Ez a K_{R5} antigén egyik alkotója. Az UDP-glükuronsav UDP-galakturonsavvá alakulását végezheti az LpsL fehérje, amely egy UDP-glükuronsav epimeráz lehet. E két gént, a pontos funkció bizonyítása érdekében, PCR segítségével izoláltuk és több lépésben expressziós vektorba klónoztuk. Mindkét esetben gyengébb expressziót kaptunk a vártnál, de az SDS-PAGE gélen felismerhetők a várt molekulatömegű fehérjék. A klónozás, termeltetés és az aktivitás vizsgálata esetében is több nehézségbe ütköztünk, így ez a munka a tervezettnél lassabban halad. Jelenleg a termeltetett enzimek aktivitásának mérését próbáljuk beállítani, illetve tervezzük jobban termelő klónok elkészítését.

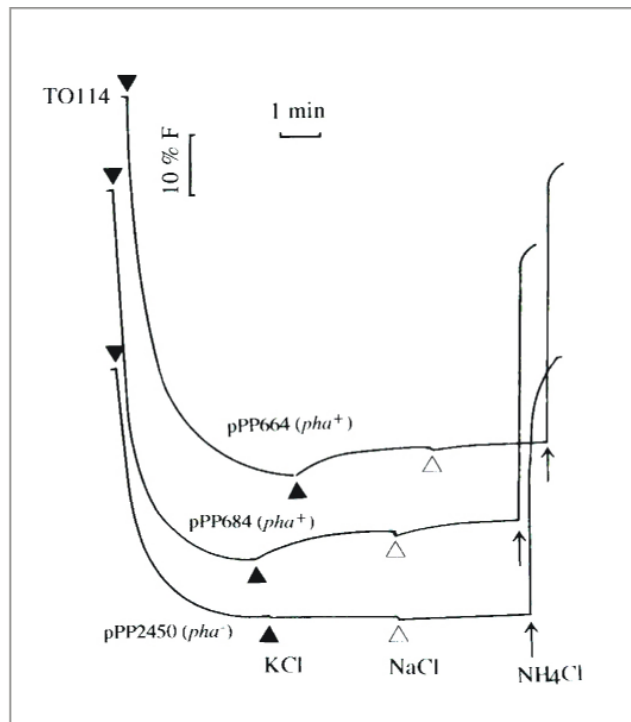
Az *rkp-3* régióban található gének szabályozásáról is szeretnénk volna többet megtudni. Ennek érdekében *lacZ* riportergén konstrukciókat izoláltunk a Tn10LK transzpozon segítségével, és szekvencia szinten is igazoltuk, hogy a létrejött fúziók valóban a megfelelő leolvasási keretekben találhatók.

Ezt követően kezdtük vizsgálni, hogy a riportter génfúziók aktivitása hogyan változik különböző fiziológiai körülmények, és különböző *rkp* génekben bekövetkező mutációk hatására. Kísérleteinknek itt is még csak az elején járunk, és a következő hónapokban tudjuk majd megválaszolni, hogy a hőmérséklet, a mikroaerob körülmények, illetve gyökér exudátum és luteolin (a *nod* gének inducere) hogyan befolyásolják a génexpressziót. Ez utóbbi két esetben meghatározzuk a baktériumok által termelt KPS mennyiségét is. Ezekből a kísérletekből választ kaphatunk arra, hogy milyen faktorok befolyásolják a KPS termelését, van-e hatása a növény

által kibocsájtott vegyületeknek a KPS bioszintézisre. A munka jelentős részét egyetemi hallgatók bevonásával végeztük és végezzük, ami sokszor hátráltatja a kísérletek elvégzését.

1.5. A pH adaptációban résztvevő Pha fehérjék szerepének vizsgálata

Korábban izoláltuk a szimbiotikus gümő inváziójában fontos *phaABCDEFGF* géncsoportot, amelyről feltételezzük, hogy egy, a pH homeosztázisban szerepet játszó K^+/H^+ -antiportert kódol. Ezt kísérletekkel az elmúlt években sikerült jobban alátámasztani kooperációs partnerünk, Dr. Tatsunosuke Nakamura segítségével (Laboratory of Membrane Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan).



3. ábra: A *pha* gének K^+/H^+ antiportert kódolnak

Az *E. coli* antiportereket nem tartalmazó TO114 (*ΔnhaA*, *ΔnhaB*, *ΔchaA*) törzsbe bejuttatuk a pPP664 (*pha*⁺) (A), a pPP684 (*pha*⁺) (B) vagy a pPP2480 (*phaA1::Tn5*) (C) kozmidklónokat. Ha a bejuttatott DNS K^+/H^+ antiportert kódol, akkor a transzformánsokból készített kifordított membránvezikulumok KCl adására (▲) H^+ -ionokat bocsájtanak ki. Ez pH-változást okoz, ami egy fluoreszcens festék segítségével mérhető (fluorescence quenching).

1.5.1. A *pha* gének egy K^+/H^+ antiportert kódolnak

A K^+/H^+ antiporter aktivitásának vizsgálatára az *E. coli* esetében már régóta használatosak a kifordított membránvezikulumok. A vezikulumokban a K^+/H^+ antiporter a külső K^+ -koncentráció növelésekor K^+ -ionokat szállít a belső térbe és H^+ -ionokat bocsájt ki. A növekvő külső H^+ -ionkoncentráció egy fluoreszcens festék segítségével nyomon követhető (3. ábra).

Az *S. meliloti* vad típusú és *pha* mutáns baktériumokból megpróbálkoztunk kifordított membrán vezikulumokat izolálni, de a vad típusú minták esetében sem tudtuk az alapvető antiporter-aktivitásokat (K^+/H^+ , Na^+/H^+) kimutatni.

Alternatív lehetőségként a *pha* géneket hordozó kozmidklónt juttattuk be egy olyan *E. coli* törzsbe, amelyből minden antiporter gént eltávolítottak (TO114, *ΔnhaA*, *ΔnhaB*, *ΔchaA*). Ha a

kozmidklón hordoz antiporter géneket, és azok kifejeződnek az *E. coli* sejtekben, akkor a törzsből készített membrán vezikulumokban ezt az aktivitást ki kell tudnunk mutatni. Negatív kontrollként a pPP2480 kozmidszarmazékot alkalmaztuk, amelyen a *phaA* gént egy Tn5 inszerció inaktiválta. A 3. ábrán látható, hogy KCl adásakor a vad típusú *pha* géneket tartalmazó *E. coli* mintákban gyenge pH-változás, azaz H⁺-kiáramlás volt mérhető. A *phaA::Tn5* mutációt hordozó kozmid esetében ez nem következett be. Valószínű tehát, hogy a *pha* gének egy K⁺/H⁺ antiportert kódolnak.

1.5.2. Egy *pha* homológ géncsoport szerepének vizsgálata

A *S. meliloti* genomproject eredményeként kiderült, hogy a genomban egy *pha*-homológ másik géncsoport is van (*pha2*). Erről feltételezzük, hogy egy Na⁺/H⁺-antiportert kódol, mert az eddig ismert legtöbb *pha*-homológ géncsoportról ezt bizonyított. Ez alól az egyetlen kivétel eddig az általunk azonosított *phal* géncsoport volt, aminek a K-transzportban betöltött szerepét elsőként igazoltuk. A *S. meliloti pha2* gének szerepének vizsgálatára azonosítottunk egy megfelelőnek tűnő klón PCR segítségével, egy *S. meliloti* klóntából. Ezen inszerció mutációkat hoztunk létre, hogy a mutációkat visszajuttatva a genomba azok fenotípusát megismerjük. Sajnos a munka közben, az ellenőrzésként elvégzett szekvencia meghatározásokból kiderült, hogy nem sikerült a megfelelő klón azonosítanunk, és az nagy valószínűséggel nem is található meg a felhasznált géntárban. Ezért feltételezzük, hogy a *pha2* géneket hordozó klón *E. coli* sejteken nem stabil.

Hogy mutációt hozunk létre a géncsoportban, ezt követően a genomikus DNS-t használva direkt izoláltuk PCR segítségével a *phaA2* és *phaB2* géneket és részleges szekvencia meghatározással igazoltuk, hogy a megfelelő DNS-szakaszokat sokszoroztuk meg. A két szakasz közé egy kanamicin rezisztenciagént építettünk. Ezt a konstrukciót megfelelő vektorral bejuttatva *S. meliloti* kívánjuk a *phaA2::Km^R* mutáns létrehozni. Ha ez elkészül fiziológiai kísérleteket végzünk a fenotípus meghatározására.

2. PUBLIKÁCIÓK

2.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent

Péter Putnoky, Veronika Deák, Krisztina Békási, Adrienn Pálvölgyi, Anita Maász, Zsuzsanna Palágyi, Gyula Hoffmann, Ildikó Kerepesi (2004) H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol* **186**:1591-1597 Impakt: 4,15

2.2. Kongresszusokon bemutatott anyagok

Putnoky Péter Kerepesi Ildikó, Nagy Enikő, Nagy Tibor, Bradley L. Reuhs (2003.) Mi a szerepe az *rkpY* génnek? V. Magyar Genetikai Kongresszus 2003. április 13-15, Siófok összefoglalók: p141.

Nagy Tibor, Deák Veronika, Pálvölgyi Adrienn, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter (2005.) Az *rkpRST* gének és a kapszuláris poliszacharid bioszintézis *Sinorhizobium meliloti* baktériumban VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok 2005. április 10-12. Eger összefoglaló: p133.

2.3. Várható további publikációk

Peter Putnoky, Enikő Nagy, Tibor Nagy, Ildikó Kerepesi, Attila Kereszt (2006) Genetic dissection of kapsular polysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* 41: the role of *rkpY*, *rkpTS* and *rkpR* genes *kézirat elkészítés alatt*.

Az elmúlt négy év munkájából ezen kívül még legalább egy, nemzetközi folyóiratban megjelenő publikációt tervezünk két éven belül.

2.4. Egyéb publikációk

A tanszékünkhöz tartozó, korábbi OTKA projekt (T025822) befejező molekuláris kísérleteit is elvégeztük, és ebből is készítettünk egy tudományos publikációt. A köszönetnyilvánításban a T038377 támogatás kódja is szerepel.

Matics, R., S. Varga, B. Oppen, A. Klein, G. Horváth, A. Roulin, P. Putnoky, and G. Hoffmann (2005) Partitioning of genetic (RAPD) variability among sexes and populations of the barn owl (*Tyto alba*) in Europe. *J Raptor Res*: 39 (2): 142-148. Impakt: 0,414

ÖSSZEFOGLALÓ

Hosszú távú célunk, hogy megértsük a szimbiotikus nitrogénkötő gümő kifejlődését, és azonosítsuk az invázióban fontos bakteriális géneket. E pályázatban feladatunk volt, hogy (i) elemezzük azon *rkp* géneket, melyek a *Sinorhizobium meliloti* 41 törzs specifikus KR5 kapszuláris poliszacharidjának bioszintézisében vesznek részt, (ii) meghatározzuk pontos funkcióját a *pha* géneknek, melyekről feltételeztük, hogy a pH-homeosztázisban fontosak.

Fágreceptorban hibás baktérium és host range fág mutánsok molekuláris genetikai elemzése révén kimutattuk, hogy a *16-3* fág receptorának fontos alkotója az RkpM fehérje, és azonosítottuk a fág *h* génjét, mely a farki rost fehérjét kódolja. A KR5 antigénről kimutattuk, hogy csak a szimbiotikus gümő inváziójakor fontos, de nem alkotója a fágreceptornak.

Befejeztük a DNS-szekvencia meghatározást az *rkp-3* régióban, és vizsgáltuk az azonosított gének szerepét. Egyes és kettős *rkpY* mutánsok segítségével, amelyekben a második mutáció különböző *rkp* génekben volt kimutattuk, hogy (i) az *rkpY* mutánsok által termelt poliszacharid nem prekursora a KR5 antigénnek, és hogy (ii) az *rkpR* gén ennek az új poliszacharidnak a bioszintézisében játszik szerepet.

A *pha* gének szerepét kifordított membrán vezikulákon végzett fiziológiai kísérletekben vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a K^+ adás proton kiáramlást eredményez, ami alátámasztja korábbi feltételezésünket, hogy e gének egy K^+/H^+ antiporterrel kódolnak.

SUMMARY

Our long term goal is to understand the development of nitrogen fixing symbiotic nodule and to identify bacterial genes involved in the invasion. In this project we focus on (i) the analysis of the *rkp* genes involved in the biosynthesis of the strain specific KR5 polysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* 41, and (ii) analysis of function of *pha* gene clusters presumed to be important in pH-homeostasis.

The molecular genetic analysis of phage receptor bacterial and host-range phage mutants resulted in the identification of the RkpM protein as an essential part of the *16-3* phage receptor, and in the identification of *h* gene of the phage encoding the tail-fiber protein. The KR5 antigen were shown only to be important in the invasion of symbiotic nodule but not in the structure of phage receptor.

DNA-sequence analysis of the *rkp-3* region was completed and the role of the identified genes were examined. Using single and double *rkpY* mutants, where the second mutations were in different *rkp* genes, it was shown that (i) the polysaccharide produced by the *rkpY* mutant was not a precursor of the KR5 antigen, (ii) the *rkpR* gene is involved in the synthesis of this new polysaccharide.

The role of the *pha* genes were examined on everted membrane vesicles. It was shown that addition of K^+ results in proton efflux supporting our hypothesis that *pha* genes encode for a K^+/H^+ antiporter.