

Szakmai zárójelentés a  
„**Secreted proteins as signalling molecules in Streptomyces development**”  
című, **IB1** zsúrihez tartozó **T/F 042824** számú pályázatról.

*A végleges minősítés kialakításához kérem az előkészületben lévő és később megjelenő publikációk figyelembe vételét is.*

**Bevezetés:**

*1. A kutatás állása a pályázat benyújtásakor*

A Gram-pozitív Streptomycesek tanulmányozása spóráképződéssel végződő micéliális növekedésük, mint differenciálódási modell (Chater, 1989; 1998; 2001) és a differenciálódással együtt járó szekunder metabolitok termelése miatt (melyek között nagyszámban találunk orvosi és ipari szempontból fontos vegyületeket /Strohl, 1997/) egyaránt fontos.

A morfológiai differenciálódást és a vele összefonódó szekunder metabolizmust a legrészletesebben a modell mikroorganizmusnak számító *Streptomyces coelicolorban* vizsgálták szilárd táptalajon (Chater, 1998; Hopwood 1999). Mivel az iparilag fontos antibiotikumokat egyéb *Streptomyces* törzsek termelik, s folyékony táptalajon, ezért ezek vizsgálata különösen indokolt (Strohl, 1997).

A sejtdifferenciálódás és szekunder metabolizmus szabályozásában Streptomycesekben extracelluláris regulátorok, ún. autoregulátorok, kulcsszerepet játszanak. Ezek egyik csoportja a kismolekulájú  $\gamma$ -butirolaktonok csoportja, melyek legismertebb tagja az A-faktor. Az A-faktor *S. griseusban* mind a légmicélium képzést, mind a streptomycin termelést szabályozza (Khokhlov, 1991). Az A-faktor bioszintézisét, s hatásmódjának genetikáját részletesen tanulmányozták (Horinouchi és Beppu 1992; Horinouchi 1996; Ohnishi és mtsai 2005). Az A faktorhoz hasonló vegyületeket más *Streptomyces* fajokban is azonosítottak és vizsgáltak (Yamada és mtsai 1997).

A Streptomycesek differenciálódásának egy másik, fehérje természetű autoregulátora az általunk ugyancsak *S. griseusban* leírt C faktor, amely egy extracelluláris fehérje, s a differenciálódásban és a sejtek közötti kommunikációban játszik szerepet.

A *S. griseus* mind szilárd táptalajon, mind folyadék kultúrában jól spórázik. Szilárd táptalajon a sporuláció kezdetekor a levegő irányába, a szubsztrátmicéliumra merőlegesen légmicélium nő, amelyből később spórák keletkeznek. Azokat a mutánsokat, amelyek nem képesek légmicéliumot fejleszteni, megjelenésük miatt kopasz (bald) mutánsoknak nevezzük. *Streptomyces griseusban* több ilyen mutánst, s a mutáció komplementálására

képes gént is izoláltak (McCue és mtsai 1996). Különböző A-faktort termelő és nem termelő kopasz mutánsok a mi laboratóriumunkban is rendelkezésre állnak.

A C faktort a folyékony tenyészetben is jól spórázó *S. griseus* 45H törzs fermentlevéből izoláltuk (Szabó és mtsai 1962; Biró és mtsai 1980). A C faktor hatására a C faktorra érzékeny, C faktort nem termelő és mélytenyészetben nem spórázó *S. griseus* 52-1 törzs a sporulációra jellemző prespórákat hoz létre. A hatás specifikusságára jellemző, hogy már 0,5 ng/ml C faktor koncentráció kiváltja. A hatás a differenciálódás stádiumának függvénye. Csak a leoltáskor, vagy a növekedés első 16 órájában adott C faktor hatásos. A hozzáadott C faktor a táptalajból gyorsan eltűnik azt a sejtek valószínűleg felveszik.

A C faktor hatását, génjének (*facC*) klónozását, szekvenálását és analízisét részletesen vizsgáltuk (Birkó és mtsai 1999; Szabó és mtsai 1999). A gén csak néhány, elsősorban olyan *Streptomyces* törzsben található meg, amelyek folyékony tenyészetben is spóráznak. Így például hiányzik a *S. coelicolor* és *S. lividans* törzsekből.

A gén transzkripciójának vizsgálata további adatokkal támasztotta alá a sporuláció szabályozásában betöltött szerepét (Biró és mtsai 2000). A jelen pályázat szempontjából különösen érdekes, hogy a C faktor olyan *S. griseus* törzs (B2682) A-faktor hiányos spontán kopasz mutánsának (*S. griseus* B2682 AFN) a sporulációját is helyreállította, amely nem tartalmazza a C faktor génjét (Biró és mtsai 2000). Egy A-faktort termelő kopasz (*S. griseus* B2682 AFP) mutáns spóráképzésének C faktor általi helyreállítását is kimutattuk (Biró és mtsai 2000).

C terminálisan hisztidinnel farkazott C faktort fejeztettünk ki *E. coli*-ban (Biró és mtsai 2001). Ez a fehérje biológiailag aktív, s ezt használtuk olyan fehérjék izolálására, amelyek a C faktoralal kölcsönhatásba lépnek a differenciálódás szabályozása során. A C faktor termelő törzsből génmegszakítással null mutánst állítottunk elő. Ez a mutáns szilárd táptalajon nem képes légmicélium és spóra képzésére (Biró, nem közölt adatok).

Adatainkból arra következtetünk, hogy a C faktor a *Streptomyces*ek differenciálódásának extracelluláris, pleiotrop hatású regulátora.

Az első *Streptomyces* törzs, a *S. coelicolor* genomi szekvenálása, amely 2001-ben befejeződött, s amelyet Sir David Hopwood és a John Innes Centre *Streptomyces* munkacsoportja koordinált, új helyzetet teremtett a *Streptomyces*ek kutatásában ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_coelicolor/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/)).

A *Streptomyces* törzsek között nyilvánvalóan meglévő törzs specifikus különbségek ellenére úgy gondoljuk, hogy a sporuláció lépései az egyes törzsekben hasonlóan játszódnak le, s a

különböző regulációs útvonalak is összefüggenek, s kölcsönhatásban állnak. Erre utalhat az a megfigyelésünk is, hogy a *S. griseus* B2682 törzs, amely szilárd és folyékony tenyészetben egyaránt jól spórázik, ill. annak kopasz mutánsa nem rendelkezik a C faktor génjével, de a kopasz mutáns normál spóráképzése a klónozott C faktor génnel helyreállítható (Biró és mtsai 2000).

Az ismert *S. coelicolor* és *S. griseus* gének és ennek következtében a fehérjék homológiája magas (Biró és Chater, 1987; Bolotin és Biró, 1990; Biró *S. griseus* gének összehasonlítása a *S. coelicolor* adatbázissal). Ez a magas homológia feltehetően lehetővé teszi egyes fehérjék azonosítását a 2D gélből visszaizolált triptikus fragmentjeinek MS vizsgálatával. Ennek alapján úgy gondoljuk, hogy a jól spórázó *S. griseus* törzs (*S. griseus* B2682), a nem spórázó mutáns(ok) (*S. griseus* B2682 AFN) és C faktort hordozó spórázó transzformánsaik (*S. griseus* B2682 AFN/pSGF4) fehérje expressziós profiljainak összehasonlítása értékes adatokat szolgáltat a *Streptomyces* differenciálódás komplex folyamatának szabályozásáról.

2. A pályázat benyújtása után, illetve a kutatás során szerzett, a kutatás menetét befolyásoló ismeretek

1. Az egyik ilyen új információ a C faktor termelő törzs taxonómiai besorolására vonatkozik. A *S. griseus* 45H törzsről, melyet ez idáig a *S. griseus* 52-1 törzs mutánsának tartottunk, s melynek származása és taxonómiai besorolása korábban is kérdéses volt (Fehér és Szabó, 1978) 16S rDNS szekvencia meghatározással megállapítottuk, hogy ez a törzs nem *S. griseus*, s ennek megfelelően nem is a *S. griseus* 52-1 törzs leszármazottja, hanem egy abban az időben, ugyanabban a laboratóriumban vizsgált törzssel, a flavofungin termelő *S. falvofunginivel* azonos, azaz feltehetőleg egy mutánsnak hitt laboratóriumi kontamináció (Biró és mtsai, kézirat előkészületben).

2. A pályázat futamideje során további *Streptomyces* fajok genomi szekvenciája vált ismertté (*S. avermitilis*; <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>, illetve *S. scabies*; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_scabies/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/), továbbá információnk volt/van arról, hogy a *S. griseus* genomi szekvenciája is meghatározás alatt állt ill. már el is készült, de annak eredménye egyelőre nem hozzáférhető, prof Horinouchi, személyes közlés), melyek megerősítették azt a korábbi feltételezésünket, hogy a gének nagyfokban homológok, s ennek megfelelően a fehérjék azonosíthatóak lesznek.

A genomszekvenciák alátámasztották korábbi adatainkat, hogy a C faktor gén csak néhány *Streptomyces* törzsből található meg (a növény patogén *S. scabies* tartalmaz egy, a C faktorhoz nagy fokban homológ gént).

A *S. griseus* genomjának szekvenálása és a Horinouchi professzor munkacsoportja által az A-faktor hatásmódjáról közölt publikációk (Kato és mtsai 2002; Kato és mtsai 2005; Tomono és mtsai 2005; Onishi és mtsai 2005), melyek a genomikai szekvenálással nyilvánvalóan összefüggenek, pedig arra inspirált bennünket, hogy a tervezett proteomikai vizsgálatainkat a *S. griseus* törzsekre, s az A-faktor és C faktor által indukált szignál transzdukciós rendszer tanulmányozására, s a két regulátor hatásának esetleges összefüggéseire koncentráljuk. Emellett más mutánsokat is vizsgáltunk, melyek közül a *S. griseus* B2682 törzs SY1 mutánsára vonatkozó eredményeket mutatom be, mely mutáns nemcsak minimál, hanem tápanyagban gazdag tápfolyadékban is spórát képez, s a sejtosztódás szabályozásában résztvevő SsgA fehérjét túltermeli.

### **Kísérleti rendszer leírása**

*S. griseus*-ban a butyrolacton A-faktor a sejtdifferenciálódás és streptomycin termelés autoregulátora (Ohnishi és mtsai 2005) mely hatását az AdpA transzkripció aktivátor gén bekapcsolásával végzi azáltal, hogy azt, az ArpA protein repressziója alól felszabadítja, hozzákötődve ehhez a fehérjéhez. Az AdpA ezután olyan géneket aktivál, melyek funkciója a morfológiai differenciálódás és a szekunder metabolizmushoz szükséges. Ezek a gének egy regulont az ún. AdpA regulont alkotják.

Az A-faktort nem termelő törzsek sporulációra nem képesek, és streptomycint sem termelnek.

Korábban kimutattuk, hogy a *S. griseus* B2682 törzs, mely termel A-faktort, és streptomycint egy A-faktort nem termelő spontán mutánsa (*S. griseus* B2682 AFN) spóráképzésre nem képes ún. kopasz telepet képezni, és streptomycint sem termel. Ennek a törzsnek a normális sporulációja és streptomycin bioszintézise egyaránt helyreállítható volt externálisan adott A-faktorról, és a C faktor génnek a törzsből való transzformálásával kis (és nagy kópiaszámú) plazmidon. A kiskópia számú plazmiddal transzformált törzs jele *S. griseus* B2682 AFN/pSGF4.

Kísérleteink döntő részében a fent megjelölt három törzs extracelluláris proteomjának meghatározásával és összehasonlításával a C faktor által ki- vagy bekapcsolt géneket kívántuk azonosítani és összehasonlítani az A-faktor által indukált szignál transzdukciós útvonal eseményeivel.

Ugyancsak vizsgáltuk az SsgA túltermelő spontán mutáns SY1 törzs extracelluláris proteomját.

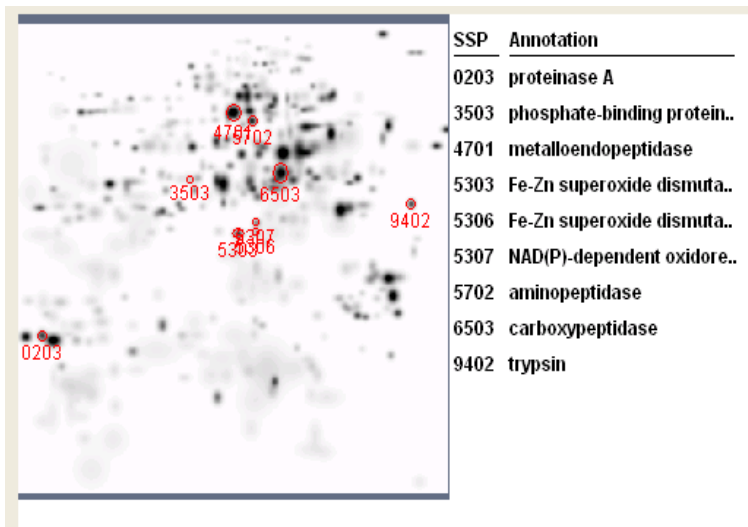
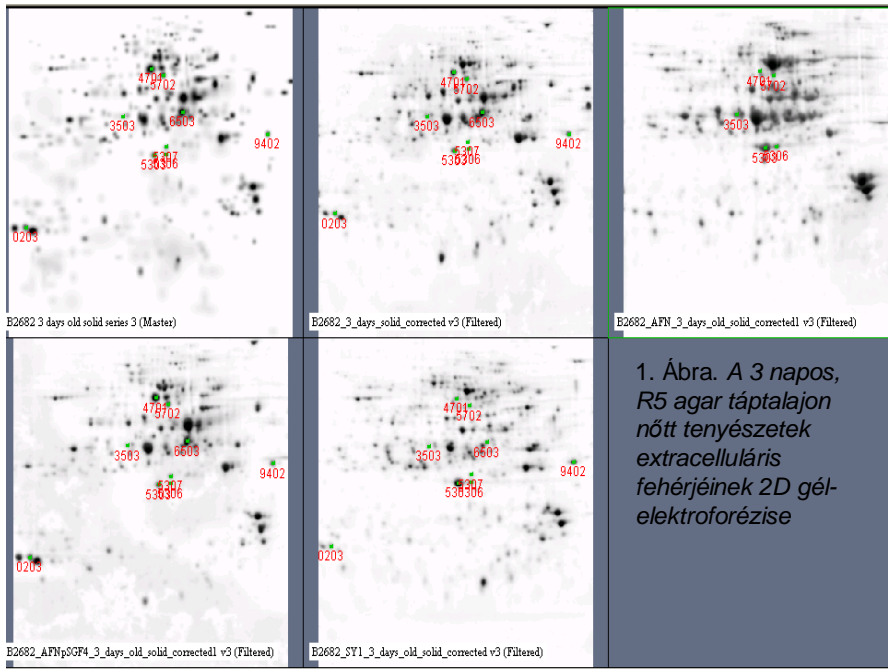
### **Módszerek**

Az alkalmazott módszereket illetően, melyek a vizsgált törzsek tenyésztését és a fehérje minták preparálását, a kétdimenziós gél-elektroforézist és a fehérjék azonosítására alkalmazott módszereket (tömegspektrometria vagy N-terminális aminosav szekvencia meghatározás) foglalja magában a korábbi részjelentésekre utalok, s itt azokra nem térek ki.

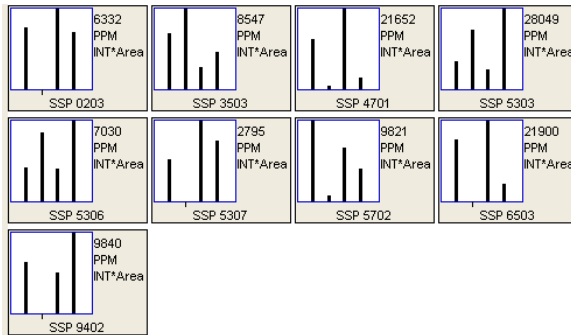
**Itt kívánom megjegyezni, hogy a kétdimenziós gél-elektroforézissel kapott gélek kiértékelését a project kapcsolódó holland költségvetéséből vásárolt GS-800 Calibrated densitométerrel és a PDQuest 2D analysis software-rel (beszerzési érték mintegy 14.000 Euro) végeztük.** Ezek azonban nem ebben a beszámolóban az OTKA felé, hanem a közeljövőben a Holland partner NWO részére készítendő zárójelentésben lesznek elszámolva.

### **Eredmények**

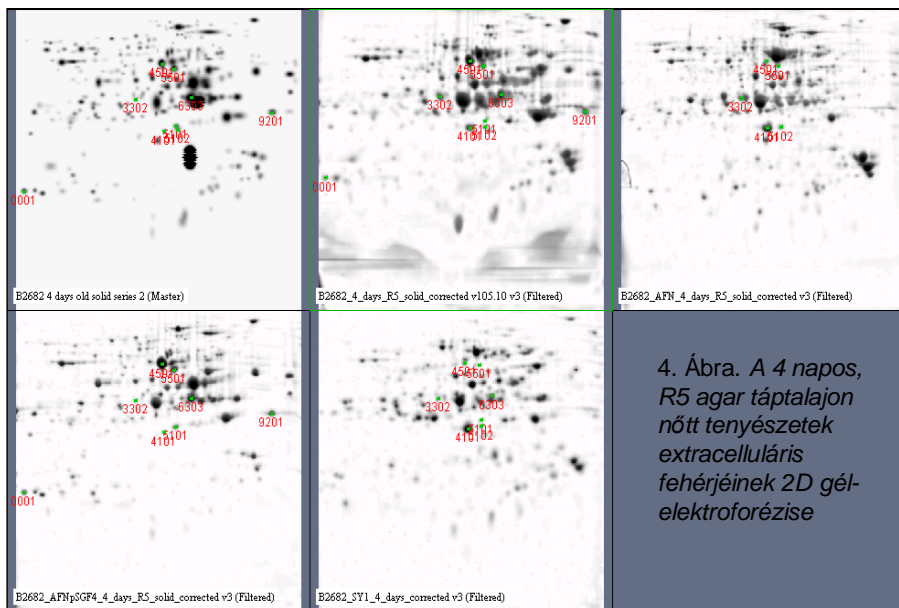
Egy reprezentatív, szilárd agar táptalajon nőtt tenyészetekkel végzett kísérletsorozat eredményét mutatom be az 1.-6. ábrákon, és az 1. táblázatban, azzal a megjegyzéssel, hogy minden itt bemutatott kísérletet legalább még egyszer, de többségében kétszer megismételtünk.

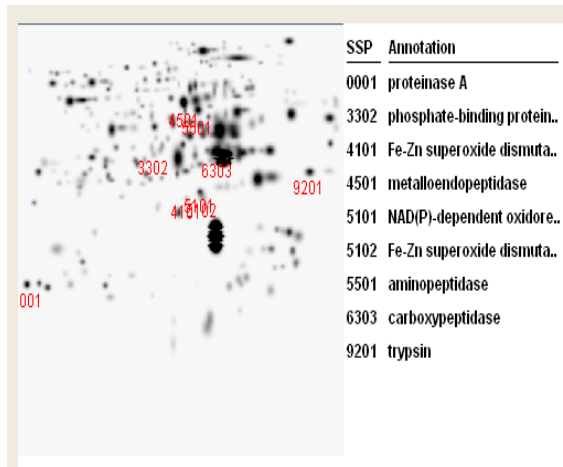


2. ábra. A 3 napos gélekből készült komputeres „master” gél

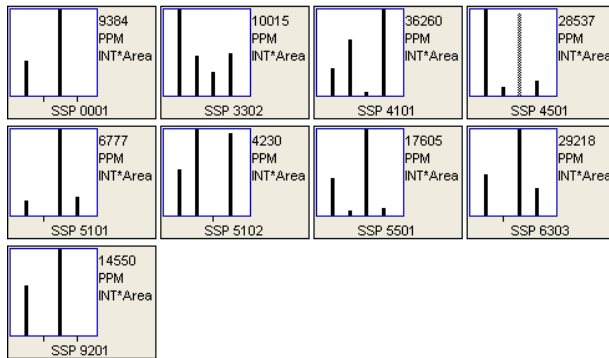


**3. Ábra. A 3 napos tenyészetek kiválasztott fehérjéinek mennyiségi analízise**





5. ábra. A 4 napos gélekből készült komputeres „master” gél



6. Ábra. A 4 napos tenyészetek kiválasztott fehérjéinek mennyiségi analízise



## 1. táblázat

Comparison of the expression of selected proteins in 3-day old cultures of *Streptomyces griseus* strains

Comparison is made to the wild type *S. griseus* B2682 strain.

SSP number	accession	name of protein	B2682	B2682-AFN	B2682-AFNpSGF4	B2682-SY1
0203	P00776	proteinase A precursor SprA	present	absent	up	down
3503	CAB65418	phosphate-binding protein precursor, PstS	present	up	down	down
4701	BAC21011	metalloendopeptidase SgmA	present	down	up	down
5303	AAD30139	Fe-Zn superoxide dismutase SodF	present	up	unchanged	up
5306	AAD30139	Fe-Zn superoxide dismutase SodF	present	up	unchanged	up
5307	CAH94303	NAD(P)-dependent oxidoreductase StrU	present	absent	up	unchanged
5702	P80561	aminopeptidase SGAP	present	down	unchanged	down
6503	P18143	zinc-carboxypeptidase precursor Cpase	present	absent	unchanged	down
9402	BAD24662	trypsin SprU	present	absent	unchanged	up

Comparison of the expression of selected proteins in 4-day old cultures of *Streptomyces griseus* strains

Comparison is made to the wild type *S. griseus* B2682 strain.

1	P00776	proteinase A precursor SprA	present	absent	up	absent
3302	CAB65418	phosphate-binding protein precursor, PstS	present	down	down	down
4501	BAC21011	metalloendopeptidase SgmA	present	down	up	down
4101	AAD30139	Fe-Zn superoxide dismutase SodF	present	up	absent	up
5102	AAD30139	Fe-Zn superoxide dismutase SodF	present	up	down	up
5101	CAH94303	NAD(P)-dependent oxidoreductase StrU	present	absent	up	absent
5501	P80561	aminopeptidase SGAP	present	down	up	absent
6303	P18143	zinc-carboxypeptidase precursor Cpase	present	absent	up	absent
9201	BAD24662	trypsin SprU	present	absent	up	absent

Az 1. ábrán sorrendben az alábbi törzsek 3 napos, R5 agar táptalajon nőtt tenyészetek extracelluláris fehérjéinek 2D gél-elektroforézisét mutatom be: *S. griseus* B2682 master gél, *S. griseus* B2682, *S. griseus* B2682/AFN, *S. griseus* B2682/AFN/pSGF4, *S. griseus* B2682 SY1.

A 2. ábrán a master gélen bejelölve azok a kiválasztott fehérjék vannak kiemelve, amelyek expressziója a vad típushoz képest megváltozott, ezért expresszióját vizsgáltuk, és azonosítottuk.

A 3. ábrán pedig a fehérjék mennyiségi analízise van megadva, a PDQuest program értékelése alapján.

Az 4. ábrán sorrendben az alábbi törzsek 4 napos, R5 agar táptalajon nőtt tenyészetek extracelluláris fehérjéinek 2D gél-elektroforézisét mutatom be: *S. griseus* B2682 master gél, *S. griseus* B2682, *S. griseus* B2682/AFN, *S. griseus* B2682/AFN/pSGF4, *S. griseus* B2682 SY1.

A 5. ábrán a master gélen bejelölve azok a kiválasztott fehérjék vannak kiemelve, amelyek expressziója a vad típushoz képest megváltozott, ezért expresszióját vizsgáltuk, és azonosítottuk.

A 6. ábrán pedig a fehérjék mennyiségi analízise van megadva, a PDQuest program értékelése alapján.

Az 1. táblázatban foglaltuk össze az 1.-6. ábrákon látható, az egyes tenyészetek között talált fehérje expressziós mintázat különbségeket. Ez ebben a kísérletsorozatban összesen kilenc fehérjét jelent. Ennél lényegesen több fehérje folt kivágása és MS analízise történt meg, de a *S. griseus* genomi szekvencia hiánya a fehérjék jelentős részének azonosítását akadályozta. (Az alább leírt kísérletsorozatban 49 fehérjéből kilencnek az azonosítása sikerült.) Ezek az adatok azonban a *S. griseus* genomi szekvencia publikálása után felhasználhatóak, s így további fehérjék is azonosíthatóak lesznek.

Néhány ismert összefüggés a táblázatban szereplő fehérjékről a felsorolás sorrendjében:

*Proteinase A prekursor SprA:*

A proteináz A prekursor mind a 3 mind a 4 napos tenyészetekben az A-faktor negatív mutánsban eltűnik, majd a C faktor transzformánsokban a vad típusúnál is magasabb szinten újra expresszálódik.

Az SY1 törzs 3 napos tenyészetében expressziója magas, ami 4 napos korra megszűnik.

A gént először Henderson és mtsai írták le 1987-ben, ami a fehérjénk azonosítását lehetővé tette. Horinouchi munkacsoportjából Tomono és mtsai 2005-ben írták le, hogy *S. griseusban* az 5 chymotrypszin típusú szerin proteáz génből az SprA, SprB és SprD az AdpA kontrollja alatt állnak. A fehérjék nagyon hasonló expressziós profilja arra utal, hogy ezek funkciója hasonló. A legnagyobb proteáz aktivitással az SprA és SprB rendelkezik, mivel génjük deléciója a proteáz aktivitás döntő részének elvesztésével jár, hasonlóan az AdpA gén deléciójához. Az SprA és SprB gének deléciója a normál légmicélium és spóráképzést nem befolyásolja, ami arra utal, hogy funkciójuk redundáns.

*Foszfát kötő fehérje prekursor PstS:*

A foszfát intracelluláris szintje és a foszfát regulációja mind a differenciálódás, mind az antibiotikum szintézis szempontjából fontos. *S. coelicolor* és *S. lividans* pstS deléciós mutánsainak differenciálódása és spóráképzése szilárd táptalajon felgyorsul. A gén egyetlen példányban képes ezt a mutációt komplementálni, s helyreállítani a vad típusú foszfát transzportot és sporulációt (Diaz és mtsai 2005).

Expressziója a törzsekben, a tenyészetek korával jelentős fluktuációt mutat mind az A-faktor hiányos mutánsban és transzformánsában, mind az SY1 törzsben.

*Metallo-endopeptidáz SgmA:*

Szintje az A-faktor hiányos törzsben és az SY1 törzsben mind a 3 mind a 4 napos tenyészetekben csökken a vad típushoz képest, és a C faktor transzformánsokban újra megemelkedik, még a vad típusúnál is magasabb szintre.

Kato és mtsai a Horinouchi csoportból leírták, hogy a *S. griseusban* egy zink tartalmú metallo-endopeptidáz az adpA kontrollja alatt áll, s expressziója a morfológiai differenciálódással összefügg. Szerepe valószínűleg más proteázokkal együtt a szubsztrát mycélium hidrolízise, s ami a degradált fehérjék aminosavainak újrahasznosítását szolgálja a légmicélium képzés során. A fehérje keletkezésekor egy N-terminális pre, pro-szekvenciát és

egy C-terminális pro-szekvenciát is tartalmaz, amelyek levágódása után jön létre az érett fehérje. Feltételezik, hogy a fehérje a saját érését, és más fehérjék érését is katalizálja.

*Fe-Zn superoxide dismutase:*

Szintje az A-faktor negatív törzsből és az SY1 mutánsban a vad típusú törzsből ill. az AFN mutáns transzformánsához képest magas. A 2D géljeinken ez a fehérje két helyen, azonos móltömeggel de kissé eltérő izoelektromos ponttal volt megtalálható.

A baktériumok általában két superoxide dismutázzal rendelkeznek, melyek az oxidatív stressz elleni védekezés eszközei. *Streptomyces coelicolor*-ban a Fe-Zn SOD szintje a superoxidot produkáló ágensek adásakor megnő (Kim és mtsai 1998). Szintjének változása feltehetőleg a szubsztrát micélium és légmicélium oxidatív stressz szempontjából eltérő helyzetének reflexiója. *Streptomyces pristinaespiralis*-ban a SOD expressziója az spbR (egy butirolakton típusú autoregulátor receptor fehérje) kontrollja alatt áll (Folcher és mtsai, 2001).

*NAD(P)-dependent oxidoreductase StrU:*

A fehérje az A-faktort nem termelő kopasz mutánsban nem mutatható ki, s a mutáns C faktor transzformánsában szintje újra megemelkedik, még a vad típusú törzsnél is magasabb szintre. StrU streptomycin bioszintetikus útvonal részeként valószínűleg a streptidine vagy N-methyl-L-glucosamine szintézisében vesz részt *S. griseus*-ban és *S. glaucescens*-ben. Génje az StrR pozitív regulátor kontrollja alatt áll, ami viszont a „master” regulátor AdpA kontrollja alatt (Retzlaff és Distler 1995; Beyer és mtsai 1996;).

*Aminopeptidase SGAP:*

Szintje az A-faktor negatív mutánsban igen alacsony, mely a transzformánsban helyreáll, sőt 4 napos tenyészetben igen magas. Azonosítását az tette lehetővé, hogy a fehérje különleges enzimikus sajátosságai miatt korábban többen tanulmányozták, s szekvenciája is rendelkezésre állt (Spungin és mtsai 1989; Ni és mtsai 2003).

*Zinc-carboxipeptidase precursor Cpase:*

Az enzim a 3 és 4 napos tenyészetek esetében az A-faktor negatív törzsből nem detektálható, s expressziója az SY1 törzsből is alacsony, de a C faktor transzformánsban igen megemelkedik. Az enzim azonosítását korábbi szekvenálása tette lehetővé (Narahashi 1990).

### *Trypsin SprU:*

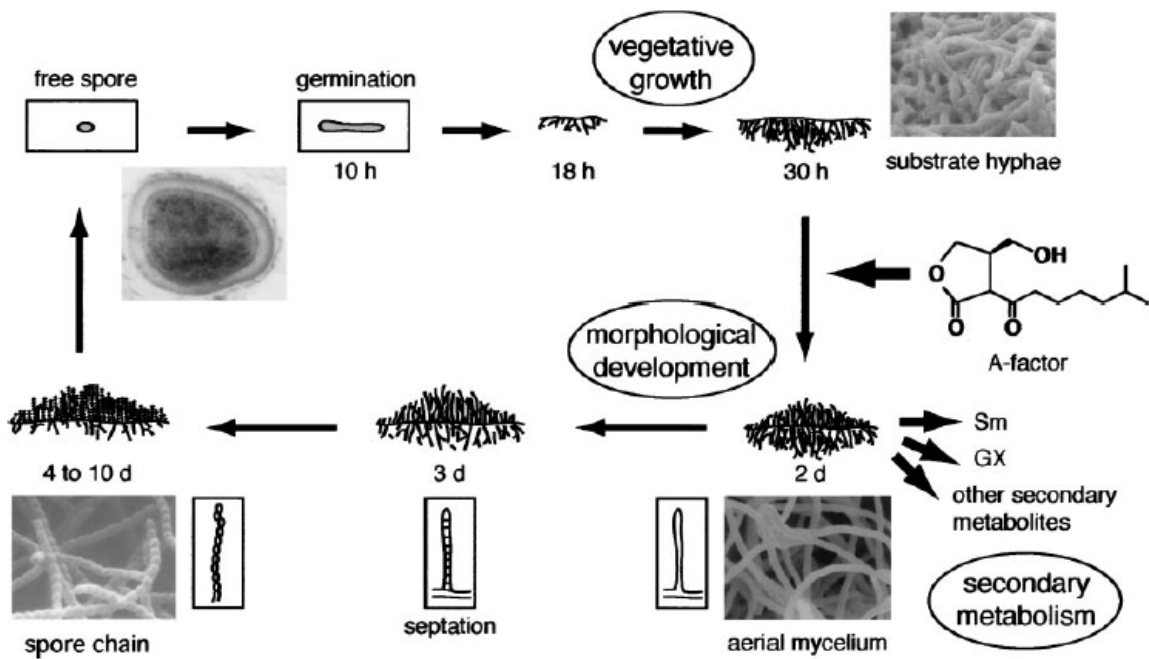
Az A-faktor mutánsban mind 3 mind 4 napos korban eltűnik, s a C faktor transzformánsokban újra expresszálódik, szintje a vad típusban észlelnél is magasabb. A kettős mutánsok trypsin aktivitása nullára esik le, ami arra utal, hogy *S. griseus*-ban csak ez a két trypsin gén létezik. Az *SprT* transzkripciója eredményezi a trypsin aktivitás nagyobb részét, mivel az erre a génre mutáns törzs trypsin aktivitása drámaian csökken. Horinouchi csoportjából Kato és mtsai írták le, hogy az *sprT* és *sprU* gének az *AdpA* kontrollja alatt állnak. Szerepük azonban nem létfontosságú, vagy funkciójuk redundáns, mert kettős deléciós mutánsuk légmicélium és spóráképzése normális.

Fenti kísérletsorozat szilárd agar táptalajon nőtt tenyészetek analízisét mutatja. Folyékony tenyészetek extracelluláris proteomjának vizsgálata igen hasonló eredményt adott, ami arra utal, hogy a differenciálódás kulcslépései szilárd és folyékony tenyészetekben hasonlóak.

### *Az azonosított fehérjék és a Streptomycesek differenciálódása közötti valószínűsíthető összefüggés:*

A *Streptomyces*ek egyetlen spórából kiinduló növekedésük során szilárd agar táptalajon először hosszú, keresztfalat csak ritkán tartalmazó multinukleáris, elágazó micéliumot hoznak létre, mely átszövi a táptalajt. Ezt szubsztrát micéliumnak nevezik. Az exponenciális növekedés a hifa fonalak elágazásával valósul meg. A morfológiai differenciálódás első lépése a szubsztrát micéliumra merőleges légmicélium megjelenése, mely kannibál módon, a szubsztrát micélium degradálásával, annak anyagait (fehérjék, nukleinsavak, tartalék tápanyagok, pl. glikogén) felhasználva növekszik. Ehhez olyan enzimek szintézisére és szekretálására van szükség, amely a szubsztrát micélium anyagait lebontja, azaz proteázok, nukleázok, és egyéb degradatív enzimek. A légmicélium később szinkron módon szeptum képződésével uninukleáris kompartmentekké alakul, melyek végül is spórákká érnek. Ennek a folyamatnak a szabályozásában vesznek részt a különböző autoregulátorok, mint az A-faktor, vagy C faktor (7. ábra).

A növekedés fő vonásokban folyékony táptalajon is hasonló, bár csak néhány törzs képes spóráképzésre.



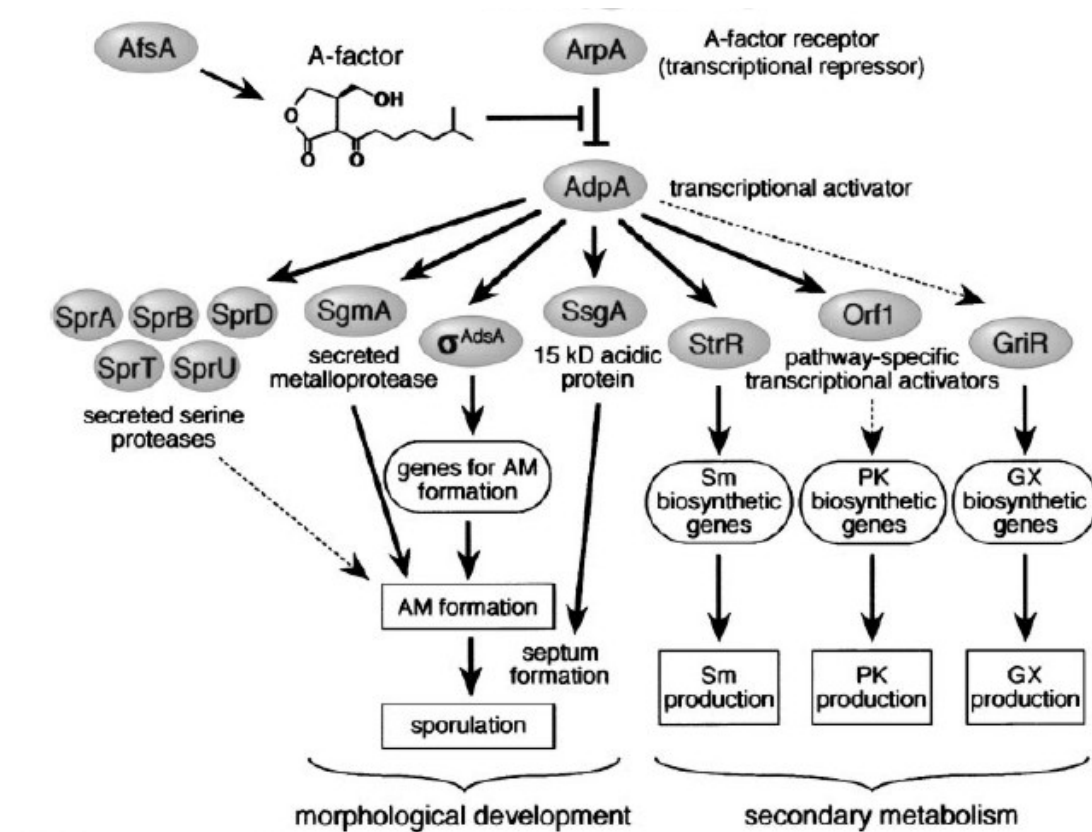
7. ábra. A *Streptomyces griseus* morfológiai differenciálódása, és az A-faktor hatása a differenciálódásra.

A fentebb leírt kísérletsorozatban azonosított, és az 1. táblázatban felsorolt fehérjék mindegyike olyan enzim, amely vagy degradatív enzimaktivitása miatt (proteinase A prekursor SprA, metalloendopeptidase SgmA, aminopeptidase SGAP, zinc-carboxypeptidase prekursor Cpase, trypsin SprU), vagy más módon (pl. oxydatív stressz elleni védelem – Fe-Zn szuperoxyde dismutase SodF, foszfát metabolizmus stb.) de a differenciálódás egyes stádiumában specifikusan expresszálódik és vesz részt.

Külön érdekes, hogy a fehérjék többsége *S. griseus*ban az A-faktor regulációja alatt áll (Ohnishi és mtsai 2005; és 8. ábra.), és ennek megfelelően expressziójuk a vad típusú törzsben (*S. griseus* B2682) és annak A-faktor hiányos mutánsában (*S. griseus* B2682 AFN) eltér.

További érdekesség, hogy ezeknek a fehérjéknek az expressziója egy olyan törzsben, amely C faktort gént nem is tartalmaz, a C faktor génnek a törzsbe történő transzformációja hatására nagyjából visszaáll a vad típusban észlelt szintre.

Ez arra utal, hogy a sporulációs program szabályozása egy komplex hálózatban képzelhető el, ahol az egyes regulációs útvonalak egymással összeköttetésben vannak, közöttük kölcsönhatás és átjárhatóság van.



8. ábra. Az A-faktor hatásmechanizmusa, s az általa aktivált AdpA regulonba tartozó fehérjék, s expressziójuk következménye (légmicélium képzés és sporuláció, streptomycin termelés, SsgA termelés, polyketon antibiotikum termelés, grixazone termelés).

## Irodalom

- Beyer S., Diestler J & Piepersberg W. (1996): The str gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway specific regulation by StrR. *Mol. Gen. Genet.* **250** 775-784.
- Birkó Zs., Schauwecker F., Pfennig F., Szeszák F., Keller U., & Biró S. (2001): Rapid one-step purification of biologically active His-tagged factor C by Ni affinity column chromatography. *FEMS Microbiology Letters.* **196(2)** 223-227.
- Birkó Zs., Sümegi, A., Vinnai A., Wezel G., Szeszák F., Vitális S., Szabó P., Kele Z., Janáky T., Biró S. (1999): Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145** 2245-2253.

- Biró S., Birkó Zs., & van Wezel G. P. (2000): Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. *Leeuwenhoek J. of Microbiology* **78(3-4)** 277-285.
- Biró S., & Chater K. F. (1987): Cloning of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces lividans* genes for glycerol dissimilation. *Gene* **56** 79-86.
- Biró, S., Békési, I., Vitális, S. & Szabó, G. (1980): A substance affecting differentiation in *Streptomyces griseus*. *Eur J Biochem* **103**, 359-363.
- Bolotin A., & Biró S. (1990): Nucleotide sequence of the putative regulatory gene and major promoter region of the *Streptomyces griseus* glycerol operon. *Gene*. **87** 151-152.
- Chater K. F (1989): Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends in Genetics*, **5**: 372-377.
- Chater, K. F. (2001): Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr. Opin. Microbiol.* **4(6)** 667-673.
- Chater, K. F. (1998): Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiol* **144**, 1465-1478.
- Diaz M., Esteban A., Fernandez-Abalos JM., & Santamaria RI (2005). The high-affinity phosphate binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiol.* **151** 2583-2592.
- Fehér Zs., & Szabó G. (1978): Genetic relatedness between streptomycin-producing and non-producing strains of *Streptomyces griseus*, studied by means of DNA-DNA hybridization. *Acta Biol.Acad.Sci.Hung.* **29** 165-171.
- Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen L:T:, Nguyen, K.T. Lacroix P., Bamas-Jacques N., Rinkel, M. & Thompson, C.J. (2001): Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *The J.Biol. Chem.* **276** 44297-44306.
- Henderson G., Krygsman P., Liu C., Davey C & Malek L (1987) Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **169** 3778-3784.
- Hopwood, D. A. (1999): Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiol.* **145**: 2183-2202.
- Horinouchi S & Beppu T (1992) Autoregulatory factors and communication in Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* **46**: 377-398.
- Horinouchi, S. (1996): *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. *FEMS Microbiol Lett* **141**, 1-9.



- Kato J., Chi.W., Ohnishi Y.m Hong S., & Horinouchi S (2005): Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **187** 286-295.
- Kato J., Suzuki A., Yamazaki H., Ohnishi Y. & Horinouchi S.( 2002): Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **184** 6016-6025.
- Khokhlov, A. S. (1991): *Microbial Autoregulators*. Harwood Academic Publishers, Chur-Reading-Paris-Philadelphia-Tokyo-Melbourne.
- Kim, E-J. Kim H-P. Hah Y.C. & roe J-H (1996): Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* **241** 178-185.
- McCue, L. A., Kwak, J., Wang, J., & Kathlin, K. E. (1996): Analysis of a gene that supresses morphological defect of bald mutants of *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **178** 2867-2875
- Narahashi y. (1990): The amino acid sequence of zinc-carboxypeptidase from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem* **107** 879-886.
- Ni X.S., Cossar D., Man A., Norek K., Miller D., Kearse C. & Tsvetnitsky V. (2003): Purification and characterization of recombinant *Streptomyces griseus* aminopeptidase. Protein expression and purification **30** 62-68.
- Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J., Tomono A. & Horinouchi S (2005): *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** 431-439.
- Retzlaff L. & Diestler J. (1995): The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol. Microbiol.* **18** 151-162.
- Spungi, A., & Blumberg S. (1989): *Streptomyces griseus* aminopeptidase is a calcium-activated zinc metalloprotein. *Eur. J. Biochem.* **183** 471-477.
- Strohl WR (1997): *Industrial antibiotics: Today and the future*. In: Strohl, WR (Ed) *Biotechnology of antibiotics* (pp. 1-47). Marcel Dekker, Inc. New York-Basel-Hong Kong.
- Szabó, G., Vályi-Nagy, T. & Vitális, S. (1962): A new factor regulating life cycle of *Streptomyces griseus*. in: *Genetics of Microorganisms. Proc Symp on Heredity and Variability of Microorganisms*. V. D. Timakova, ed., State Publishing House of Medical Literature, Moscow, pp. 282-292.
- Szabó, P. T., Kele, Z., Birkó, Zs., Szeszák, F., Biró, S., & Janáky, T. (1999): Identification of factor C protein from *Streptomyces griseus* by microelectrospray mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* **34** 1312-1316.

Tomono A., Tsai Y., Ohnishi Y. & Horinouchi S. (2005): Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **187** 6341-6353.

Yamada Y, Nihira T & Sakuda S (1997) Butyrolactone autoregulators, inducers of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*: Their structures, biosynthesis, receptor proteins, and induction of virginiamycin biosynthesis. In: Strohl, WR (Ed) *Biotechnology of antibiotics* (pp. 63-79). Marcel Dekker, Inc. New York-Basel-Hong Kong