

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-DNA 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 15th 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 5th 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 6th European Conference on Nitrogen Fixation, 2004

Bodogai M., Miclea S. P., Becker A., Puskas L., Dusha I.: Az *ntrR* gén transzkripciós szintet moduláló hatása *Sinorhizobium meliloti*-ben, The 6th 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*, 7th 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*, 7th European Nitrogen Fixation Conference. Aarhus, Denmark, 2006

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