

Doktori értekezés

**A *Rhizobium melloti* egy szimbiózisban résztvevő, zsírsavszintáz jellegű  
géncsoportjának szerkezeti és funkcionális analízise**

**Petrovics György**

Témavezető: Kondorosi Ádám  
MTA levelező tag

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központ  
Genetikai Intézet

Szeged, 1992

## TARTALOM

	oldal
ELŐSZÓ.....	3
RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS.....	5
1.1. A szimbiózis kialakulásának folyamata.....	6
1.2. A növény-baktérium kommunikáció a szimbiotikus kölcsönhatás folyamán.....	9
1.3. A szimbiózis során szerepet játszó <i>Rhizobium</i> gének.....	11
1.3.1. A <i>R. meliloti</i> gümőképzési ( <i>nod</i> ) génjei.....	12
1.3.1.1. A <i>nod</i> gének egy része különböző zsírsav szintáz génekkel homológ.....	14
1.3.2. A <i>R. meliloti</i> gümőfejlődésben ( <i>fix</i> ) és nitrogénkötésben ( <i>nif</i> ) résztvevő génjei.....	17
1.4. Szimbiózis specifikus növényi gének.....	18
1.5. A baktériumok poliszacharid típusú sejtfelszíni molekulái és szerepük a növény-baktérium szimbiózis során.....	19
1.5.1. A Gram <sup>-</sup> baktériumok sejtfelszíne, poliszacharid tartalmú komponensei.....	19
1.5.2. A <i>Rhizobium</i> sejtfelszíni poliszacharidjai.....	23
1.5.3. Növény-baktérium kapcsolatban résztvevő szénhidrát szignálok.....	26
1.5.4. A bakteriális poliszacharidok szerepe a gümőfejlődésben.....	27
1.6. Az értekezés eredményeihez kiindulási alapul szolgáló előzmények: a <i>R. meliloti</i> 41 <i>fix-23</i> régiójának izolálása és kezdeti analízise.....	29
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	32
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	33
3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok.....	33
3.2. Mikrobiológiai eljárások.....	35
3.3. Sejtburrok és LPS izolálása és jellemzése.....	36
3.4. Rekombináns DNS technikák.....	38
3.5. DNS szekvencia meghatározás.....	39
3.6. A DNS szekvencia adatok komputeres analízise.....	40
3.7. A $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérése.....	40
4. EREDMÉNYEK.....	41
4.1. A <i>fix-23</i> gének által meghatározott struktúra analízise.....	41
4.1.1. A baktérium sejtfelszín <i>in vitro</i> vizsgálata fágtapadási teszt segítségével.....	41
4.1.2. A sejtfelszíni struktúra kémiai természetének vizsgálata.....	44
4.2. A <i>fix-23</i> régió 1. komplementációs egységét képező DNS szakasz szerkezetének és működésének vizsgálata.....	47
4.2.1. A <i>fix-23</i> régió 1. komplementációs egységét alkotó gének szubklónoozása és szekvencia analízise.....	47
4.2.2. A <i>fix-23</i> régió 1. komplementációs egységében talált ORF-ek feltételezett fehérje termékei különböző zsírsav szintáz és poliketid szintáz enzimekkel homológok.....	51
4.2.3. A <i>fix-23</i> régió zsírsav szintáz jellegű génjei nem komplementálják a megfelelő <i>E. coli</i> mutánsokat.....	59
4.2.4. A <i>fix-23</i> régió 1. komplementációs egységét alkotó gének expressziója.....	59
5. MEGVITATÁS.....	61
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	66
7. KÖZLEMÉNYEK.....	68
7.1. Referált közlemények.....	68
7.2. Nemzetközi konferencia kiadványok.....	68
8. IRODALOM.....	70

## ELŐSZÓ

A dolgozat anyagát képező kísérleteket, melyek eredményeit megjelent vagy közlésre beküldött nemzetközi publikációkban tettük közzé, az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intéztében végeztem.

Köszönettel tartozom Alföldi Lajosnak, az intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette a kutatógárdához való csatlakozásomat. Munkámat Kondorosi Ádám, csoportunk vezetője irányította, szakmai és erkölcsi segítségével sok nehéz helyzeten segített át.

Sokat köszönhetek Putnoky Péternek, egykori szakvezetőmnek, akitől a szakma rejtelseit tanultam, és akivel éveken át együtt dolgoztunk a *fix-23* régió titkainak megfejtésén.

Szeretném megköszönni egész csoportunknak a jó hangulatot és állandó segítőkészséget, ami munkám során körülvett.

Hálás vagyok a velem dolgozó asszisztensek, Kiss Miklósné és Jenei Sándor lelkiismeretes, precíz munkájáért, amire nagy szükség volt a dolgozat megszületéséhez.

Köszönöm Borka Andrásnak és Tóth Sándornénak az ábraanyag elkészítésében nyújtott segítségüket.

A dolgozat megírása során adott szakmai tanácsokért Endre Gabriellát és Györgypál Zoltánt illeti köszönet.

Végül szeretném megköszönni családomnak a biológus életmóddal szemben tanúsított türelmét és megértését.

## RÖVIDÍTÉSEK

Am	ampicillin
<i>chv</i>	kromoszomális virulencia gének
dGTP	dezoxi-guanozin-trifoszfát
dITP	dezoxi-inozin-trifoszfát
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EDTA	etilén-diamino-tetra-acetát
EPS	exopoliszacharid
<i>exo</i>	exopoliszacharid szintézis gének
<i>fix</i>	nitrogénkötési (fixációs) gének
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
kb	kilobázis
kD	kilodalton
KDO	keto-deoxi-oktulonsav
Km	kanamicin
LPS	lipopoliszacharid
mtsai	munkatársai
<i>ndv</i>	gümőfejlődési gének
<i>nif</i>	nitrogénkötési gének
<i>nod</i>	gyökérgümőképzési (nodulációs) gének
OD	optikai denzitás
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid
ORF	nyitott leolvasási keret
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium-lauril-szulfát
Sm	streptomycin
Tc	tetraciklin
Tn5	prokarióta transzpozon típus
Tn10LK	prokarióta transzpozon típus
Tris	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Xgal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

## 1. BEVEZETÉS

A különböző nitrogén vegyületek központi szerepet játszanak az élőlények testének felépítésében és alapvető fontosságú életfolyamataikban egyaránt. A Föld légkörének 78%-át kitevő hármasszén-dioxid gázt azonban az élőlények túlnyomó többsége nem képes hasznosítani. Csak néhány prokarióta szervezet rendelkezik azzal a képességgel, hogy ezt a szinte korlátlan nitrogénforrást saját maga és egyúttal a többi élőlény számára is hozzáférhetővé tegye, a légköri nitrogént megkösse. Ez a megkötött, redukált formájú nitrogén már a legtöbb szervezet számára felvehető és hasznosítható.

A prokarióta szervezetek egy része szabadon élve képes a légköri nitrogén megkötésére (pl. *Klebsiella*, *Azospirillum*), számos baktérium azonban különböző kétszikű növényekkel alakít ki nitrogénkötő szimbiózist (Allen és Allen 1981). A *Rhizobiaceae* családba tartozó *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Azorhizobium* fajok elsősorban a *Leguminosae* családba tartozó növényekkel lépnek szimbiotikus kapcsolatba. Egy adott baktérium csak szigorúan meghatározott növényfajjal (vagy fajokkal) képes szimbiózisra, azaz a folyamat gazdaspecifikus. Egyes *Rhizobium* törzsek széles gazdaspecifitásúak, sok növényt elfogadnak partnerként (pl. *Bradyrhizobium japonicum*), míg másokra a szűk gazdaspecifitás jellemző (pl. *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum*) (Keen 1988).

A nitrogén megkötésére képes prokarióták közül kimagaslóan a leghatékonyabbak azok, amelyek gazdanövényrel szimbiózisban élve redukálják a nitrogént, ekkor ugyanis a folyamat nagy energiaigényét részben a növény fedezi.

Az ilyen típusú szimbiózis megismerése egyrészt elméleti szempontból rejteget számos érdekességet (pl. a két, rendszertanilag igen távol álló szervezet közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusának feltárása), másrészt gyakorlati szempontból is kiemelkedő jelentőségű lehet a levegő nitrogénjének biológiai úton történő hatékony megkötésének megismerése.

A növény által a talajból felvett nitrogénsókat jelenleg világszerte elsősorban kémiai úton előállított nitrogéntartalmú műtrágyákkal pótolják. Ez a módszer azonban drága és szennyezi a környezetet, hosszú távon tönkreteszi a talaj szerkezetét, mikroflóráját és -faunáját. Az egyelőre csak a természetes szimbiózisok esetén meglévő "biológiai út" ezeket a beláthatatlan következményekkel járó problémákat megoldaná.

A szimbiózist létesítő nitrogénkötő baktériumok képesek a teljes nitrogénszükséglet folyamatos ellátására, jelentősen hozzájárulva a növény fejlődéséhez, növekedéséhez, terméshozamának emeléséhez, sőt, néha egyáltalán az életben maradásához. Cserébe a baktérium szén- és energiaforrást, valamint oxigént kap a növénytől.

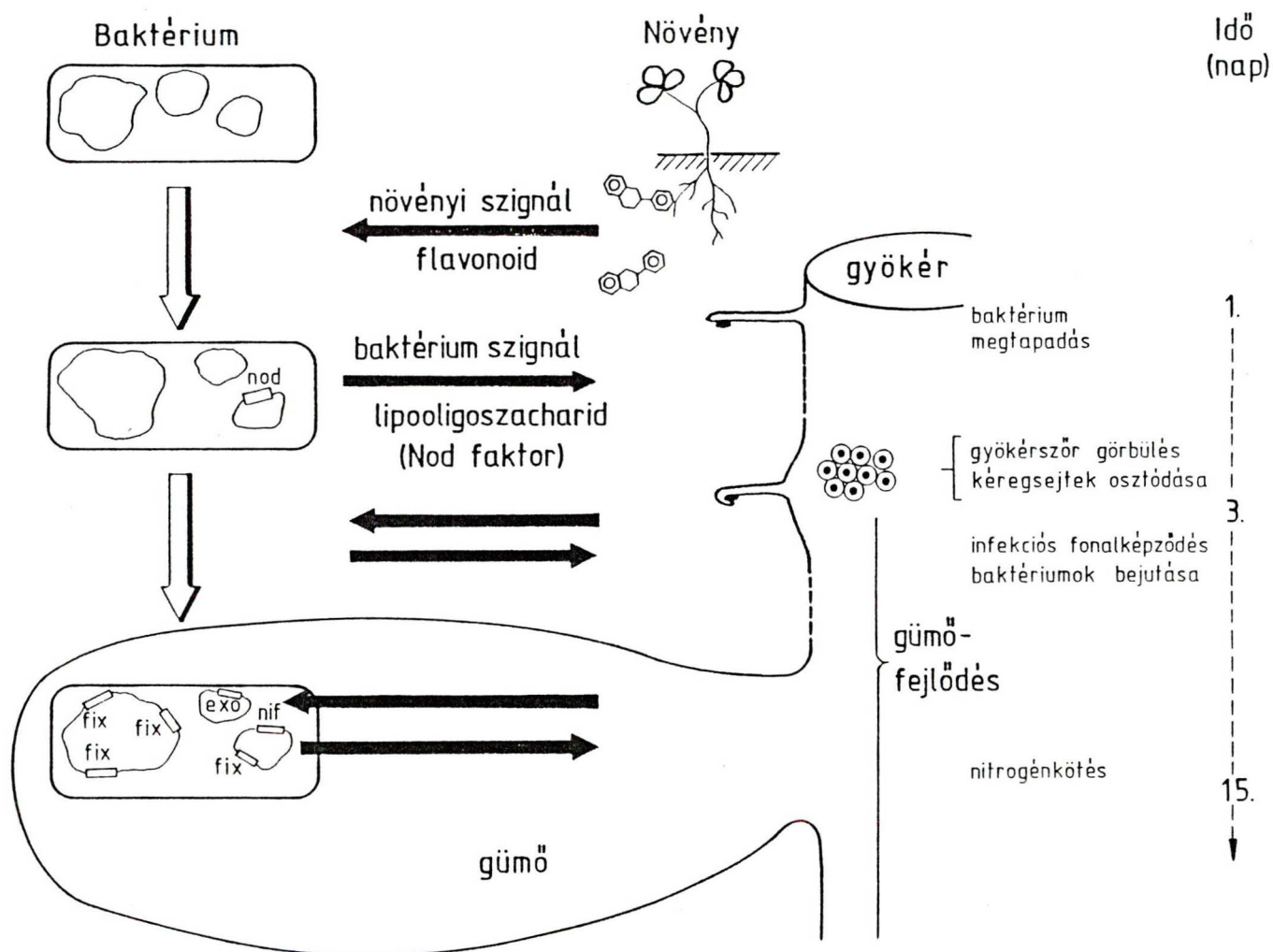
Ahhoz azonban, hogy a biológiai úton történő nitrogénellátást tetszés szerinti széles körben megvalósíthassuk, a természetes folyamat pontos megismerése, azaz részletes alapkutatás szükséges. Ez mintegy két évtizede folyik molekuláris szinten a világ különböző laboratóriumaiban, köztük a mi munkacsoportunkban is. Az általunk vizsgált, modellként használt rendszer a *R. meliloti* és a lucerna közt kialakuló szimbiózis.

### **1.1. A szimbiózis kialakulásának folyamata**

A szimbiózis kialakulása igen összetett folyamat, amely számos bakteriális és növényi gén illetve géntermék időben és térben precízen összehangolt működése, specifikus kölcsönhatása eredményeképp jön létre. A nitrogénkötésre képes szimbiózis létrejötté a *R. meliloti* és a lucerna között kb. két hétig tart. A növény és baktérium megfelelő közelségbe kerülésétől (egymás felismerésétől) számítva ennyi idő telik el a szimbiózis specifikus szervének, gyökérgümőnek a teljes kifejlődéséig.

A *Rhizobium*ok szabadon élnek a talajban, ha azonban specifikus gazdanövényük, a lucerna gyökereinek a közelébe kerülnek, érzékelnik a gyökerek által kibocsátott speciális anyagokat, melyek hatására új események

láncolata kezdődik. A szimbiózis megindulásának első látható jele a baktériumok megtapadása a lucerna gyökérszőrök felszínén. (1. ábra) (Mills és Bauer 1985).

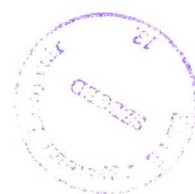


**1. ábra.** A *R. meliloti*-lucerna szimbiózis kialakulásának folyamata. Az ábra baloldali részén a baktérium és növény között folyó jelcsere sémája látható. A vastag nyilak jelzik a partnerek közötti ismert és feltételezett szignálváltásokat. Az ábra jobboldali részén a gyökér hossza mentén, mint időbeli skálán tüntettük fel a szimbiózis kialakulásának a jelcsere hatására meginduló néhány fontosabb állomását.

A megtapadás valószínűleg több, eltérő típusú mechanizmus egyidejű megvalósulása útján történik. Ezek közül a gazdaspecifikus jellegű növényi lektinek és a bakteriális sejtfelszíni poliszacharidok közötti kölcsönhatást írták le legrészletesebben (Diaz és mtsai 1989).

A megtapadt *Rhizobium*ok két, kb. egyidejű, jól detektálható hatást fejtenek ki a növényi szervezetre: Egyrészt a gyökérszőrök meggörbülését, melynek következtében a gyökérszőr szinte körülnövi, csapdába ejti a rátapadt baktériumot, másrészt - a tapadás helyétől távolabb - a gyökér kéregsejtjeinek osztódását váltják ki, azaz létrehozzák a gümőmerisztémát (1. ábra) (Dudley és mtsai 1987). A *Rhizobium*ok tapadási helyétől ezután megindul egy csőszerű képződmény, az infekciós fonal kialakulása (Turgeon és Bauer 1982). Ez a képződmény a növényi sejtfalhoz hasonló felépítésű, és a gyökérszőr töve felé, majd azon túl, az osztódásnak indult kérgi sejtek felé növekszik. A többszörösen elágazó infekciós fonal lehetőséget biztosít a baktérium számára, hogy a gyökér belsejében a növényi citoplazmával való közvetlen érintkezés nélkül eljusson az időközben már gümővé növekedett osztódó gyökér kéregsejttömeghez (Callaham és Torrey 1981). Itt a már korábban folyamatos osztódásokkal megsokszorozódott baktériumok endocitózishoz hasonló folyamat útján a növényi plazmamembrán eredetű periplazmatikus membránba "csomagolva" bejutnak a gümősejtekbe. További osztódásuk leáll, és számos egyéb változás következtében bakteroidokká alakulnak.

Ezalatt a gümőt képező növényi sejtek is specializálódnak, struktúrált, többféle típusú sejtből álló szerv alakul ki belőlük. Számos új növényi fehérje expressziója kapcsolódik be, közülük a leghemoglobin felelős a nitrogénkötés enzimének működéséhez szükséges alacsony oxigén tenzió biztosításáért (Powell és Gannon 1988). Az érett gümőkben a bakteroidok végzik a levegő nitrogénjének redukálását a nitrogenáz enzim segítségével. Az így keletkező ammónia aminosavakba (elsősorban glutaminba) épül be, majd eljut a növény legkülönbözőbb anyagcsere útjaiba (Schubert 1986).



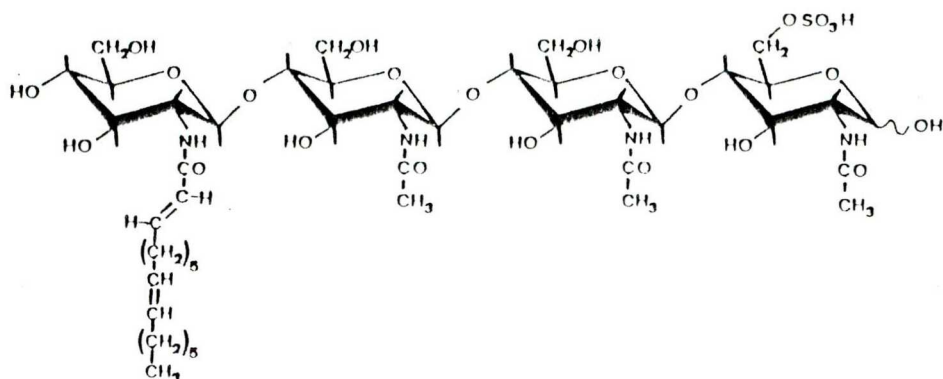


## 1.2. A növény-baktérium kommunikáció a szimbiotikus kölcsönhatás folyamán

Az 1.1. fejezetben említettük a már feltárt, a szimbiózis folyamán kulcsfontosságú szerepet játszó kommunikációs lépéseket. A kölcsönös felismerés első lépcsőfokaként a növény gyökerei által kibocsátott flavonoid típusú másodlagos anyagcseretermékek specifikus hatást gyakorolnak a növény közelébe került baktériumokra (1. ábra). A *Rhizobium*okban a gümőképzési (nodulációs) gének közé tartozó *nodD* génről folyamatosan átíródik egy szabályozó fehérje. A növényi eredetű flavonoidok (a lucerna-*R. meliloti* szimbiózis esetén elsősorban a luteolin) a NodD fehérjével kölcsönhatva kötődnek a többi, operonokba szerveződött *nod* gént reguláló DNS szakaszokhoz, az ún. *nod*-boxokhoz. Ennek következtében a szabadon élő baktériumban egyébként nem expresszálandó *nod* operonok kifejeződnek (Kondorosi és Kondorosi 1986).

A termelő Nod fehérjék egy részének ismert a biokémiai funkciója. Ezek egy anyagcsereút tagjaiként szintetizálnak egy lipo-oligoszacharidot, az ún. Nod faktort, ami válaszeljül szolgál a gazdanövény számára (1. ábra). A *R. meliloti* elsőként leírt Nod faktora, a NodRm-1, kétszeresen telítetlen zsírsavval acilált glükózamin tetraszacharid, mely tartalmaz egy szulfát és három acetát csoportot is (2. ábra) (Lerouge és mtsai 1990).

A növényi flavonoid szignál hatására tehát lipo-oligoszacharid típusú jelmolekulát termel a baktérium, mely önmagában, *Rhizobium* sejt nélkül is képes előidézni a gümőképzési folyamat legkorábbi látható jeleit, a gyökérszőr deformációját (Bánfalvi és Kondorosi 1989) és a növényi sejtosztódás megindítását (Schmidt és mtsai 1988) (1. ábra). Kiderült, hogy a baktériumok többféle jelmolekulát termelnek, melyek alapvetően hasonló típusúak ugyan, de kis szerkezeti eltéréseik - eddig még tisztázatlan módon - befolyásolják a gazdaspecifitást (Schultze és mtsai 1992).



**2. ábra.** A *R. meliloti* gümőképzési szignálmolekulájának (NodRm-1 faktor) kémiai felépítése. A négytagú glükózamin oligoszacharid váz szubsztituensei egy acil (16 tagú, kétszeresen telítetlen zsírsav), három acetil és egy szulfát csoport.

A Nod szignál hatására megindult gümőképzési folyamat azonban gyorsan leáll, a gümőfejlődés későbbi lépéseinek lejátszódásához valószínűleg további kölcsönös szignál váltások szükségesek. Ilyen gümőfejlődési szignál szerepet tölthetnek be a baktérium sejtfelszíni poliszacharid típusú molekulái, melyekről az 1.5. fejezetben lesz szó.

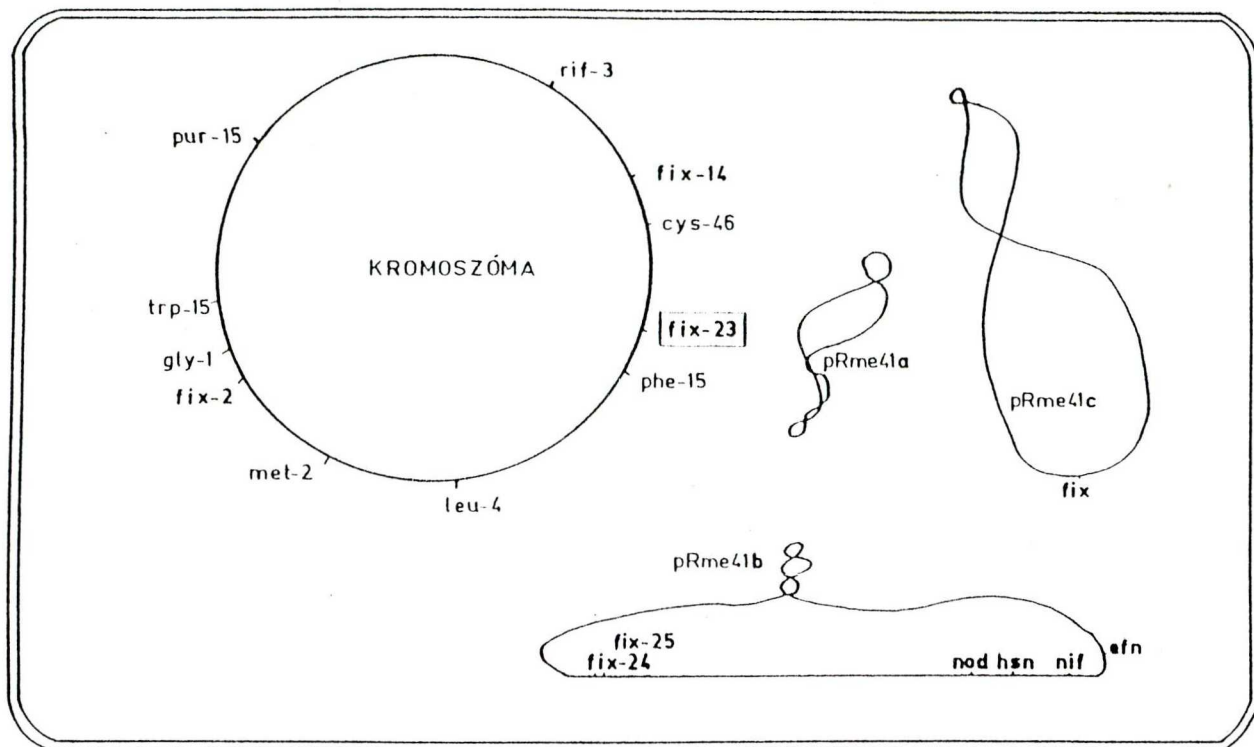
Számos olyan molekulát azonosítottak már növényekből, melyeket a sejtek specifikus jelként ismernek fel. A régóta ismert növényi hormonok általában többirányú (pleiotrop) hatást fejtenek ki. Leírtak néhány poli- és oligopeptid típusú jelmolekulát, valamint számos olyan mikroba toxint, melyek különböző növényeken általános vagy gazdaspecifikus jellegű szignál aktivitást fejtenek ki. Az utóbbi időben fény derült arra, hogy specifikus oligoszacharidok is lehetnek a növényi sejtek számára szignál aktivitásúak (Hahn és Cheong 1991). Ezeket az eredményeket elsősorban növények és patogén mikrobák kölcsönhatásának vizsgálata során érték el.

A szimbiózis során specifikus szignálként szolgáló lipo-oligoszacharid típusú Nod faktorok felfedezése és szerkezetük feltárása újabb bizonyítéka annak, hogy az oligoszacharidok fontos szerepet játszanak a növényi sejtek kommunikációs folyamataiban. A növények és mikrobák közötti jelcsere vizsgálata egyre jelentősebb mértékben járul hozzá ahhoz, hogy a növényi sejtek jelzésmechanizmusainak molekuláris alapjait megismerjük.

### 1.3. A szimbiózis során szerepet játszó *Rhizobium* gének

A szimbiózisban szerepet játszó bakteriális gének két nagy csoportba sorolhatók. A gümőképzési (nodulációs, *nod*) gének a gümő kialakulásának korai szakaszához szükségesek, hibájuk esetén vagy nem jön létre gümő, vagy késleltetve ill. csökkent mértékben alakulnak ki gümők a gazdanövényen. A fixációs (*fix*) gének a gümőfejlődés későbbi stádiumaiban játszanak szerepet, mutációjuk esetén kialakul ugyan gümő, de nitrogénkötésre nem lesz képes. A *fix* gének egy csoportja (a nitrogénfixációs, *nif* gének), a nitrogén megkötéséhez szükséges fehérjéket kódolja. E gének megfelelői a szabadon élő nitrogénkötő baktériumokon is megtalálhatók (pl. *Klebsiella*).

A *nod* és *nif* gének eléggé szorosan csoportosítva a baktérium kromoszómáján kívül, egy hatalmas, kb. 1.5 Mb méretű megaplazmidon (pRm41b, más néven pSymb) helyezkednek el (3. ábra) (Bánfalvi és mtsai 1985). Egy hasonló méretű megaplazmidon (pRm41c, azaz pSymc) az EPS termelésben szerepet játszó *exo* gének nagy része található (Finan és mtsai 1986). Mindkét megaplazmidon és a kromoszómán is több helyen szétszórva lokalizáltak *fix* géneket (3. ábra). Egy kisebb, kb. 0.4 Mb-os megaplazmid jelenlétét is kimutatták *R. meliloti*-ban, melynek a szimbiózisban játszott szerepe ismeretlen.



**3. ábra.** A *R. meliloti* 41 genom szerveződése. A pRme41b megaplazmidra a pSymb, a pRme41c megaplazmidra a pSymbc elnevezést is alkalmazzák.

### 1.3.1. A *R. meliloti* gümőképzési (*nod*) génjei

A szimbiózisban szerepet játszó géncsoportok közül a *nod* géneket ismerjük legalaposabban. Egy részüket a különböző *Rhizobium* fajok között kicserélhető, azonos feladatot ellátó, erősen homológ gének (közös *nod* gének) alkotják (Kondorosi és mtsai 1984). Másik csoportjuk az egyes fajokban eltérő funkciójú és felépítésű gazdaspecifikus *nod* gének (Horváth és mtsai 1986). Külön csoportba kell sorolnunk a *nodD* géneket, melyek a szabadon élő *Rhizobiumban* is átíródnak. Minden *Rhizobiumban* található ugyan *nodD* gén, mégsem tipikus közös *nod* gén,

rendelkezik számos gazdaspecifikus tulajdonsággal is (Horváth és mtsai 1987). A *nodD* gén terméke regulátor fehérje, mely alapvető szerepet játszik a többi *nod* gén szabályozásában.

E fehérjén kívül a *nod* gének szabályozásához a gazdanövény gyökerei által kibocsátott specifikus flavonoidokra (*R. meliloti* esetén luteolinra), valamint a *nod* operonok előtt található erősen konzerválódott cisz regulátor DNS szakaszokra (*nod*-box) van szükség (Rostás és mtsai 1986). A *R. meliloti*-ban 6 *nod*-box található, a különböző *nod* operonok transzkripció startpontjai előtt 26-28 bp távolságra. A NodD fehérje N-terminális részének egy szakaszáról bebizonyosodott, hogy a *nod*-boxhoz kötődik, és e rész a DNS-kötő fehérjék jellegzetes aminosav mintázatát mutatja (helix-turn-helix). A variábilis C-terminális rész feltehetően a növényi faktorról (pl. luteolinnal) lép kölcsönhatásba (Burn és mtsai 1989).

A különböző NodD fehérjék, melyeknek elsősorban a C-terminális része tér el egymástól, különböző növényi inducereket ismernek fel. *R. meliloti*-ban három különböző funkcionális *nodD* kópia is jelen van, melyek flavonoid felismerése részben eltérő (Györgypál és mtsai 1988).

A közös *nod* gének egy operonba szerveződtek (*nodABC*) (Török és mtsai 1984). Ezek mutációja esetén áll le a legkorábbi stádiumban a szimbiózis, a gyökérszőr görbülés és a gyökér kortikális sejtjeinek osztódása nem indul meg, s természetesen nem képződik gümő (Nod<sup>-</sup>). A *nodAB* gének termékei a citoplazmában, a NodC fehérje a baktérium külső membránjában lokalizálható (John és mtsai 1988).

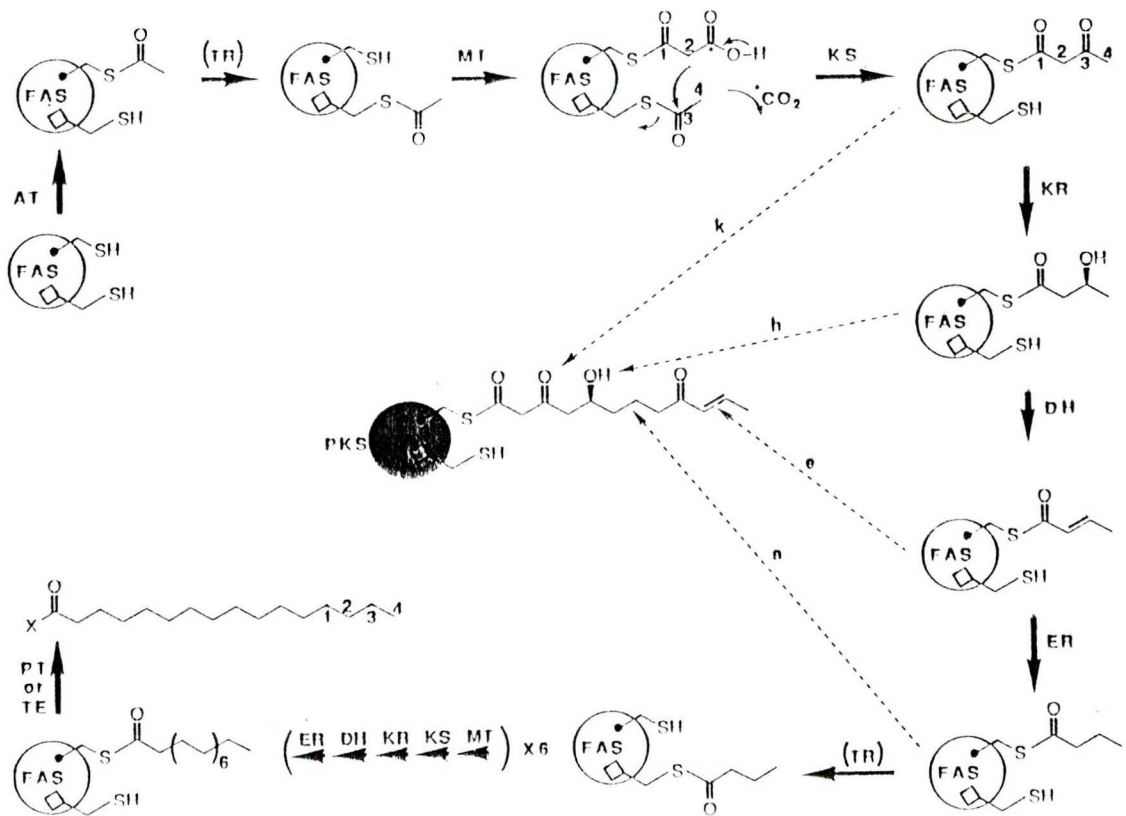
A *R. meliloti* gazdaspecifitási gének (*nodEFGHLMNOPQ*) is operonokba csoportosultak. Mutációjuk hatására megváltozik azon növények köre, melyekkel a baktérium szimbiotikus kapcsolatba képes lépni, ill. adott gazdanövényeken a gümőképzés lelassulhat vagy a gümők száma csökkenhet (Horváth és mtsai 1986).

A *nod* gének egy részéről már bebizonyosodott, másokról feltételezik, hogy a NodRm-1 faktor kialakításában vesznek részt. Számos további gümőképzési gént azonosítottak, ezek funkciója azonban még ismeretlen.

### 1.3.1.1. A *nod* gének egy része különböző zsírsav szintáz génekkel homológ

Nagyon kevés gümőképzési gén pontos biokémiai funkciója ismert. DNS szekvencia analízis alapján kiderült, hogy legalább négy *nod* gén (*nodFELG*), melyek a NodRm-1 szignál molekula zsírsav részének felépítésében játszanak szerepet, jelentős hasonlóságot mutat különböző szervezetek zsírsav szintézisében résztvevő génjeivel (Horváth és mtsai 1986, Shearman és mtsai 1986, Bibb és mtsai 1989, Hopwood és Sherman 1990).

Az esszenciális zsírsavak szintézise az egész élővilágban hasonló séma alapján, hasonló enzimatikus alapfunkciók megfelelő sorrendben történő ismétlésével zajlik (4. ábra). Ennek megfelelően hasonló gének kódolják a résztvevő enzimeket. Eukarióták közül élesztőből, patkányból és csirkéből közöltek teljes zsírsav szintáz cDNS szekvenciákat az utóbbi években (Schweizer és mtsai 1986, Chirala és mtsai 1987, Mohamed és mtsai 1988, Amy és mtsai 1989, Holzer és mtsai 1989, Schweizer és mtsai 1989). E szervezetekben a zsírsav szintáz rendszer ún. I. típusú, azaz óriási, multifunkcionális enzimek végzik az alapvető zsírsavak szintézisét. A baktériumokban ugyanezen funkciókat, amelyeket az I. típusú zsírsav szintáz esetén az enzim különböző domainjei töltenek be, különálló gének által kódolt különálló enzimek végzik (Hopwood és Sherman 1990). Ezek szekvenciája azonban még korántsem olyan jól ismert, mint a magasabbrendűeké. *Escherichia coli*ből egyetlen olyan gén szekvenciáját közölték, amely a patkány multifunkcionális zsírsav szintáz enzim egyik domainjével azonos funkciójú, és fehérje szinten is jelentős homológia mutatható ki (*fabB*) (Kauppinen és mtsai 1988).



**4. ábra.** A zsírsav szintézis és poliketid szintézis sémája. Az ábra szélein a nyilak mentén a zsírsav szintézis lépéseit tüntettük fel. A szaggatott nyilakkal (k, h, e, a) jelzett leágazások azt mutatják, hogy a zsírsav szintézis mely lépéseinél keletkezhet poliketid azáltal, hogy megszakad és előlről kezdődik a ciklus. A fehér kör a zsírsav szintáz (fatty acid synthase = FAS) enzimet, a fekete kör a poliketid szintáz (PKS) enzimet reprezentálja. Az egyes lépésekben szereplő enzimek rövidített jelzése: AT = acil transzferáz, MT = malonil transzferáz, KS =  $\beta$ -ketoacil szintáz, KR = ketoreduktáz, DH = dehidratáz, ER = enoil reduktáz, TE = tioészteráz.

A zsírsavak szintézisével azonos lépések eltérő sorrendben és számban történő ismétlésével szintetizálódnak a poliketidek (4. ábra) (Hopwood és Sherman 1990). Nem meglepő tehát, hogy az egyes lépéseket a zsírsav szintázokhoz nagyon hasonló enzimek végzik. A legutóbbi években számos poliketid típusú vegyület, elsősorban antibiotikum szintézisét végző, ún. poliketid szintáz gén vagy géncsoport

szekvencia analíziséből kiderült, hogy ezek a gének jelentős hasonlóságot mutatnak az előbbieken ismertetett esszenciális zsírsav szintáz génekhez (Beck és mtsai 1990, Bibb és mtsai 1989, Cortes és mtsai 1990, Donadio és mtsai 1991, Sherman és mtsai 1989). A homológia különösen szembetűnő fehérje szinten is az illető enzimek, ill. domainek aktív centrumában és annak környezetében. Ezeknek a speciális funkciót végző zsírsav szintáz jellegű géneknek az inaktiválása azonban nem vezet a szervezet pusztulásához, a létfontosságú zsírsavak termelésének hibájához, mivel e feladatot a párhuzamosan működő esszenciális zsírsav szintáz gének elvégzik.

Hasonló a helyzet a *nodFELG* génekben mutáns *Rhizobium*oknál is, ahol a létfontosságú zsírsavak zavartalan szintézise mellett csupán a szimbiózisban szerepet játszó, gazdanövényre specifikus jelmolekula termelése áll le, azaz csak a specifikus funkció sérül.

Poliketid szintáz szekvenciát több szervezetből is közöltek az utóbbi néhány évben. Ez esetben is a zsírsav szintázokhoz hasonlóan két alaptípus megléte jellemző: egyetlen multifunkcionális, vagy számos monofunkcionális enzim végzi a szintézist (Hopwood és Sherman 1990).

A zsírsav szintáz gének fejlődéséről napvilágot látott egy elmélet, mely szerint a magasabbrendűek multifunkcionális enzimét kódoló óriásgének az evolúció folyamán génfúziós események útján jöttek létre a megfelelő ősi bakteriális monofunkciós génekből (McCarthy és Hardie 1984, Hardie és McCarthy 1986). A feltevés egyelőre nem támaszkodik elegendő prokarióta szekvencia adatra, sok ponton hipotetikus jellegű, azonban logikussága vitathatatlan. Az elméletet erősíti a zsírsav szintáz jellegű *nod* gének monofunkciós volta is. Az *E. coli* zsírsav szintáz gének közeljövőben várható szekvenciaanalízise valószínűleg meghozza az elméletet megerősítő bizonyítékokat.



### 1.3.2. A *R. meliloti* gümőfejlődésben (*fix*) és nitrogénkötésben (*nif*) résztvevő génjei

Számos gümőfejlődésben hibás *fix* mutánst izoláltak az utóbbi években a különböző *Rhizobium* fajokból. Részletesebb szerkezeti és funkcionális analízis eredményei elsősorban olyan *fix* géneknél állnak rendelkezésre, amelyek különböző bakteriális poliszacharidok kialakításában vesznek részt.

*R. meliloti*-ban az *Agrobacterium* virulenciájában szerepet játszó *chv* génekkel homológ DNS szakaszokat találtak. Kiderült, hogy az *ndv* mutánsok nem képesek bejutni a gümősejtekbe (Miller és mtsai 1986). Az izolált és megszekvenált két gén (*ndvA* és *ndvB*) nukleotid sorrendje és funkciója is nagyon hasonlít az *Agrobacterium chvA* és *chvB* génjeihez, egymás szerepét helyettesíteni képesek (Dylan és mtsai 1986). A *chv* és *ndv* gének a ciklikus  $\beta$ -glükán szintéziséért felelősek, ami valószínűleg a baktérium ozmotikus alkalmazkodóképességét szolgálja.

*R. meliloti* SU47-ben a savas EPS termelését végző *exo* génekről is bebizonyosodott, hogy egyben *fix* géneknek is tekinthetők (Leigh és mtsai 1985). Vizsgálatuk részleteiről az 1.5.2. fejezetben számolunk be.

*R. leguminosarum*ból számos olyan mutánst izoláltak, melyek a *R. meliloti* *exo* mutánsokhoz hasonló fenotípust mutatnak a szimbiózis folyamán, azaz nem képesek infekciós fonal létrehozására és nem jutnak be a gümősejtekbe. Ezekben a *R. leguminosarum* mutánsokban a sejtfelszíni LPS molekulák is megváltoznak (Noel és mtsai 1986). Több ilyen LPS kialakulásban résztvevő *fix* géncsoportot azonosítottak, ezek további analízise jelenleg folyik (Cava és mtsai 1989, Prierer 1989).

Amennyiben az összes gümőképzési (*nod*) és gümőfejlődési (*fix*) gén működik, a baktériumok bejutnak a kifejlődött, differenciálódó gümőbe. A nitrogénkötéshez azonban szükség van a *nif* génekre is. Ezek nem a szimbiózisos állapotra vagy folyamatra specializálódott gének, hiszen a szabadon élő nitrogénkötő prokariótákban is megtalálhatók. Szerepük elsősorban a légköri nitrogén redukcióját



végző nitrogénáz enzimkomplex kialakítása. Ennek polipeptidjeit a *nifHDK* gének kódolják, a Fe-Mo kofaktor szintéziséhez a *nifB* gén szükséges, melyek mellett egyéb (pl. szabályozó szerepű) *nif* gének ismeretesek (Orme-Johnson 1985). A szabadon élő (pl. *Klebsiella*) és a szimbiózisban élő (pl. *Rhizobium*) baktériumok *nif* rendszerének fő különbsége szabályozásukban rejlik. Míg a *Klebsiella* többi *nif* gént szabályozó *nifA* génje a baktérium *ntr* (nitrogén regulációs) rendszerén keresztül regulálódik, a *Rhizobium* *nif* génjeit a mikroaerob körülmények kialakulása kapcsolja be (Ditta és mtsai 1987, Szeto és mtsai 1987).

#### 1.4. Szimbiózis specifikus növényi gének

A *Rhizobium*-növény szimbiózis során a növényi partnerben új, gümőspecifikus fehérjék (nodulinok) jelennek meg. Több mint 20 féle nodulin kifejeződését detektálták gümőből izolált RNS *in vitro* transzlációjával (Verma és mtsai 1986), vagy gümőspecifikus antiszérum segítségével (Bisseling és mtsai 1983).

Kiderült, hogy nem egyidőben indul meg a szimbiózis specifikus növényi fehérjék termelése. A korai nodulinok (ENOD2, ENOD12) a *Rhizobium* fertőzés után néhány napon belül kimutathatók (Scheres és mtsai 1990, van de Wiel és mtsai 1990), sőt, az ENOD2 baktérium jelenléte nélkül, az auxin transzport inhibitor kezelés hatására keletkező ún. pszeudogümőkben is megjelenik (Hirsch és mtsai 1989). E két korai nodulin magas hidroxiprolin tartalma arra utal, hogy a növényi sejtfal felépítésében vesznek részt (Scheres és mtsai 1990, van de Wiel és mtsai 1990).

Késői nodulinokat csak a baktériumokkal elárasztott, fejlődő vagy érett gümőkben mutattak ki. Kiemelkedő a leghemoglobin jelentősége, amely a lokális oxigénkoncentrációt alacsony szinten tartja, lehetővé téve ezzel az oxigén érzékeny nitrogénáz enzim működését (Appleby 1984). Ennek a csak pillangós virágúakban előforduló oxigénszállító molekulának a globin részét növényi gének kódolják, míg hem részének szintézisét baktérium gén határozza meg (Powell és Gannon 1988).

Néhány további késői nodulin gén funkcióját már leírták (pl. urikáz II) (Bergman és mtsai 1983), nagy részük szerepe azonban még ismeretlen.

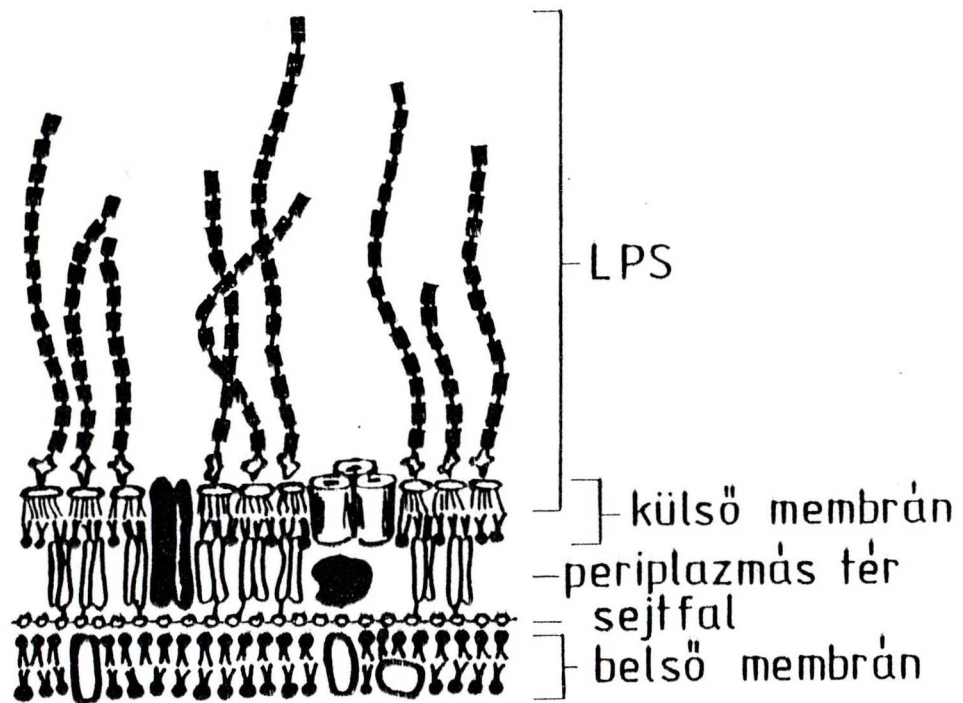
### **1.5. A baktériumok poliszacharid típusú sejt felszíni molekulái és szerepük a növény-baktérium szimbiózis során**

A rendkívül változatos struktúrájú poliszacharidok a molekuláris és celluláris kölcsönhatások fontos információs molekulatípusát képezik. A növényi differenciáció során, a növény-parazita mikroba, valamint a növény-szimbionta baktérium kölcsönhatás folyamán is szerepet játszanak oligoszacharid szignálok. Feltételezhető, hogy a Nod szignálok hatásánál későbbi stádium(ok)ban is kommunikációs szerepet töltenek be különböző oligoszacharidok a *Rhizobium*-növény kölcsönhatás során.

#### **1.5.1. A Gram<sup>-</sup> baktériumok sejt felszíne, poliszacharid tartalmú komponensei**

A Gram<sup>-</sup> baktériumok sejtburkát egy külső és egy belső membrán valamint a közöttük található sejtfa réteg (peptidoglikán) alkotja (5. ábra) (Lugtenberg és vanAlphen 1983).

A belső membrán szimmetrikus foszfolipid kettős réteg. Fehérjéi speciális enzimek és transzport molekulák, legfőbb funkciójuk az elektrontranszport, oxidatív foszforiláció, specifikus ion- és tápanyagtranszport, fehérje szekréció, szignáltranszdukció, komplex lipidek szintézise és sejtfa komponensek, többek között poliszacharidok szintézise (Lugtenberg és vanAlphen 1983).



**5. ábra.** A Gram<sup>-</sup> baktériumok sejtburkának sematikus metszete. Az ábra felső része felé irányul a baktérium külső felszíne. (A kapszuláris és exopoliszacharidot nem tüntettük fel.)

A peptidoglükán egyetlen óriási, aminocukrokból álló polimer, melyet rövid peptidek keresztkötésekkel erősítenek. A sejt merev, ozmotikus nyomásnak ellenálló vázát alkotja.

A belső és külső membrán rétege közti helyet periplazmatikus térnek nevezik, mely elsősorban különböző fehérjéket és oligoszacharidokat tartalmaz.

A sejt külső membránja nem szimmetrikus felépítésű. Belső felszíne, hasonlóan a belső membrán mindkét felszínéhez, foszfolipidekből áll. A külső felszínt azonban nagyrészt LPS molekulák építik fel (5. ábra). Az LPS molekula lipid-A, oligoszacharid mag és O-antigén poliszacharid részre osztható (Rietschel 1985). A lipid-A az a hidrofób lipid rész, amely az egész molekulát a külső membránhoz köti azáltal, hogy

beleágyazódik a kettős réteg külső felszínébe. A lipid-A jellegzetes zsírsav alkotói a  $\beta$ -hidroxi zsírsavak. A rövid oligoszacharid mag kovalens kapcsolatban áll a lipid-A-val és az O-antigén poliszacharid résszel is. Jellegzetessége, hogy legalább egy keto-deoxi-oktulonsav molekulát (KDO) mindig tartalmaz és általában specifikus heptóz, ill. néhány más cukormolekula építi még fel (pl. galakturonsav, galaktóz, mannóz). A felszínből kinyúló O-antigén poliszacharid rész a törzsre jellemző, változatos felépítésű, általában ismétlődő oligoszacharid egységekből épül fel. Laza, nem kovalens kapcsolatban áll a sejtet körülvevő EPS molekulákkal (Rietschel 1985).

A bakteriális exopoliszacharidok (EPS) egyik fő típusa ismétlődő oligoszacharid egységekből álló, nagy molekulású, általában elágazó savas poliszacharid, melyet a baktérium a sejt felszínére és a környezetébe juttat (Sutherland 1985). Számos *Rhizobium* EPS pontos szerkezeti analízisét elvégezve kiderült, hogy hasonlóak a már ismert (pl. *E. coli*, *Salmonella*) bakteriális EPS-ekhez. Ezért az EPS jellegzetességeit a *Rhizobium* sejt felszíni poliszacharidjai című fejezetben (1.5.2.) tárgyaljuk.

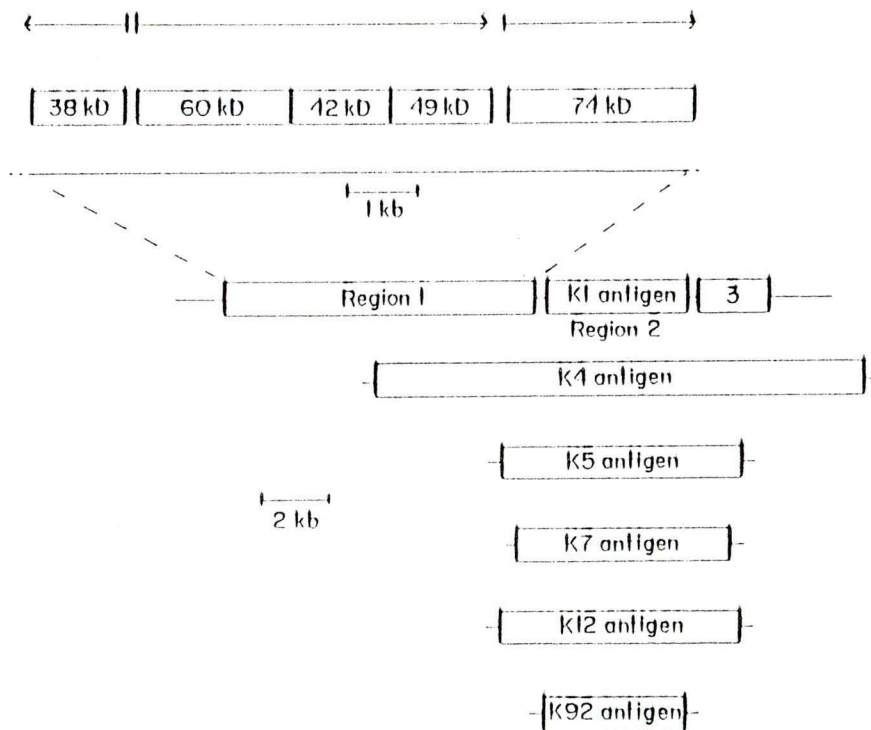
Elsősorban *E. coli* törzsek esetében ismert egy igen változatos kapszuláris poliszacharid molekulacsoport, mely antigén tulajdonsága alapján a K-antigén nevet kapta. Több mint száz típusát írták le *E. coli*-ban, melyek egy részéről bizonyították, hogy lipid résszel a sejt külső membránjához kötődik (Boulnois és Jann 1989, Jann és Jann 1990).

A K-antigének fontos szerepet játszanak a baktérium és környezete kölcsönhatásában, számos patogén mikroba virulenciájának kialakításában. Szerkezetük, szintézisük, genetikájuk megismerése gyógyászati és tudományos szempontból is lényeges. A kutatások jelenleg legintenzívebben az *E. coli* nevű baktériummal folynak.

A K-antigének nagy része két csoportba sorolható. Az I. csoport jellegzetessége, hogy 20 °C alatt is expresszálnak a szintézisében résztvevő gének, néha lipid-A-hoz kapcsolódva ágyazódnak a külső membránba, és ez a lipid rész savas pH-n és 100 °C-on nem válik le könnyen. A II. csoportba tartozó K-antigének KDO-t tartalmaznak,

a struktúrát meghatározó gének 20 °C alatt nem fejeződnek ki, a poliszacharid rész foszfátidsavhoz kapcsolódva kötődik a külső membránba, valamint savas pH-n és 100 °C-on a lipid rész könnyen eltávolítható (Jann és Jann 1990).

Genetikai szempontból ez utóbbi csoportot jobban ismerik. A poliszacharid szintézisét a *kps* gének irányítják, melyeknek három eltérő funkciójú csoportját azonosították (6. ábra) (Roberts és mtsai 1988). Az 1. géncsoport



**6. ábra.** Az *E. coli* II. típusú K-antigéneket meghatározó géncsoport felépítése. Az 1. régió, mely fölött a kódolt fehérjetermékek térképe kinagyítva szerepel, valamint a 3. régió minden feltüntetett K-antigénben konzerválódott. A poliszacharid rész felépítéséért felelős középső régió mérete és funkciója antigénként különböző.

valószínűleg a lipidhez kötött poliszacharid exportjával kapcsolatos funkciókért felelős, a 2. géncsoport határozza meg a poliszacharid szintézisét, a 3. pedig a

poliszacharid polimerizációja után szükséges, még nem teljesen tisztázott funkciókat tölt be. A 2. géncsoport minden törzsben, szerotípusban eltérő, az illető K-antigénre jellemző. Az 1. és 3. géncsoport viszont az összes II. típusú K-antigén esetén konzerválódott, ezek a különböző szerotípusok között kicserélhetők a funkció sérülése nélkül (6. ábra) (Boulnois és Roberts 1990). A gének szekvenciája még nem ismeretes. A K-antigén típusú sejt felszíni poliszacharidok alkalmasak információs molekulák szerepének a betöltésére, eddig azonban jelenlétüket *Rhizobium*okban nem írták le.

### 1.5.2. A *Rhizobium* sejt felszíni poliszacharidjai

A *Rhizobium* sejtek legfőbb poliszacharid típusai a neutrális  $\beta$ -glükánok, a savas EPS, valamint a külső membrán integráns részét képező LPS.

A neutrális  $\beta$ -glükánok  $\beta$ -1,2 kötésű glükóz molekulákból álló, 17-24 tagú ciklikus homopolimerek. Nagy részük extracelluláris, lazán a baktérium felszínére tapadt, kis részük a periplazmatikus térben is megtalálható. A neutrális  $\beta$ -glükánok a szimbiózis folyamán valószínűleg a környezethez történő ozmotikus alkalmazkodásban játszanak szerepet (Miller és mtsai 1986). Ez a passzív szerep azonosnak tűnik a *Rhizobium*-pillangós szimbiózis és az *Agrobacterium*-gazdanövény kapcsolat esetében is. Az azonos poliszacharid struktúrát meghatározó gének (*ndv*, *chv*) a különböző *Rhizobium* és *Agrobacterium* fajok közt kicserélhetők (Dylan és mtsai 1986).

A savas EPS nagy molekulású heteropoliszacharid, melyet 7-9 cukortagból álló, ismétlődő egységek (oligoszacharidok) építenek fel. Ezek az ismétlődő oligoszacharid egységek különböző  $\alpha$  és  $\beta$  kötésű, egyenes vagy elágazó lánccú cukormolekulákból állnak, gyakran nem szénhidrát szubsztituenseket is tartalmaznak (pl. szukcinát, piruvát, acetát). A poliszacharidok savas természetét az uronsavak és az említett szubsztituensek okozzák.

A *R. meliloti* fő savas EPS-e, a szukcinoglükán oktaszacharid ismétlődő egységekből áll, melyek 7 glükóz és 1 galaktóz molekulát tartalmaznak különböző  $\beta$  kötésekből, valamint 1-1 piruvát, acetát és szukcinát csoportot. A 8 cukorból 4 a fővázat, 4 pedig oldalágat alkot (Aman és mtsai 1981).

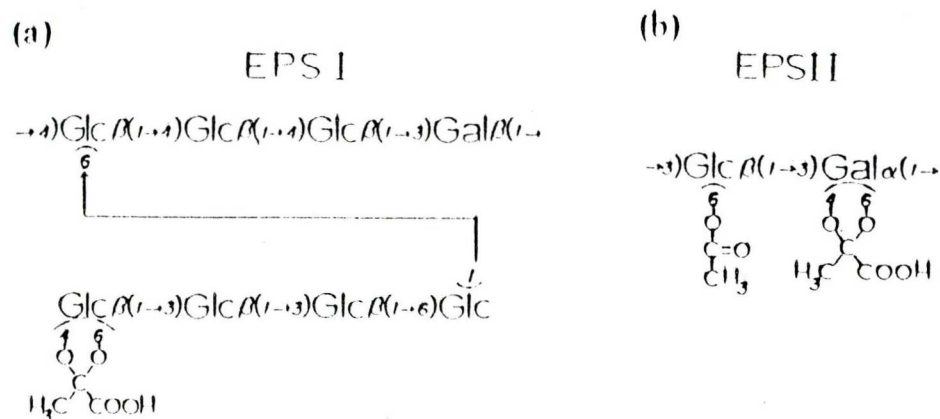
A szukcinoglükánt a baktérium mindkét membránján keresztül kijuttatja. A hosszú, elágazó láncú poliszacharid molekulák egy része lazán a baktérium felszínéhez tapad, másik része a környező közegbe jut.

A *R. meliloti* savas EPS bioszintéziséhez nukleozid difoszfát monoszacharid prekursorok (UDP glükóz és UDP galaktóz), acetilCoA, foszfoenolpiruvát, lipid carrier és a megfelelő citoplazmatikus és membránkötött enzimek szükségesek. Az ismétlődő oligoszacharid egység felépülése során a megfelelő cukoregységek az UDP cukrokról meghatározott sorrendben a membránhoz kötött lipid hordozóra tevődnek át (Sutherland 1985). Az EPS lipidhez kötött intermedier formáit *R. meliloti*-ban és sok más baktériumban is kimutatták a sejtmembrán frakcióban. A kész oligoszacharidra épülnek rá a megfelelő módosítások (piruvát, szukcinát, acetil). Az oligoszacharidok egymáshoz kapcsolódásának és a molekula külső felszínre jutásának (exportjának) mechanizmusa még nem ismeretes.

A savas EPS termelés genetikáját részletesebben *R. meliloti*-ban írták le. A megismert csaknem 20 *exo* gén nagyobb része a 2. megaplazmidon (pSymc) helyezkedik el szorosan csoportosulva, kisebb része a kromoszómán található (Long és mtsai 1988, Gray és Rolfe 1990, Reuber és mtsai 1991). A gének nagy részének szekvenciája és termékük pontos biokémiai funkciója ismeretlen.

*R. meliloti*-ban kimutattak egy másik savas EPS típust (EPSII), ami csak bizonyos körülmények között fejeződik ki, és - legalábbis egy gazdanövényen - helyettesíteni képes az EPSI szerepét (7. ábra) (Glazebrook és Walker 1989). Az EPSII szintéziséhez az *exoB* és *exoC* gének mellett legalább hat olyan gén kell, amelyek az EPSI szintézisében nem vesznek részt. E gének mind a pSymc megaplazmidon találhatóak és egy kromoszómális lókuszt (*exoR*) szabályozása alatt állnak.





**7. ábra.** A *R. meliloti* kétféle savas exopoliszacharidja. A baktérium szimbiotikus kapcsolatainak egy részében egymás szerepét helyettesíteni képes molekulák ismétlődő oligoszacharid egységeinek szerkezete. Glc = glükóz, Gal = galaktóz.

Az EPS termelés szabályozásáról kevés információ gyűlt össze. Néhány olyan *R. meliloti* gén ismeretes (*exoS*, *exoR*, *exoF*, *exoX*), melyek különböző hatással vannak az EPS szintézis és a gümőfejlődés lefolyására (Doherty és mtsai 1988).

*TnpA* transzpozíciós fúziók segítségével megállapították, hogy az *exo* gének valószínűleg elsősorban a korai szimbiotikus és az inváziós zónában expresszálnak a gümőfejlődés során. Ez a megfigyelés összhangban van az *exo* mutánsok szimbiotikus fenotípusával, ami azt mutatja, hogy a gümőfejlődés a baktériuminvázio szakaszában áll le.

A harmadik fő sejtfelszíni poliszacharid típus az LPS, amely szorosan kapcsolódik, lipid részével beépül a külső membránba. A molekula poliszacharid része kisebb az EPS-nél, nagyon változatos felépítésű, *R. meliloti* esetében valószínűleg nem ismétlődő egységekből áll, hanem összetett szerkezetű (Carlson és mtsai 1987). Jellegzetes alkotói a metilált cukrok és aminocukrok, a KDO és különböző heptózek.

Egy-egy törzs valószínűleg csak egyféle, az illető baktériumra nézve specifikus O-antigén poliszacharidot szintetizál, s ennek szerepe lehet a szimbiotikus kapcsolat gazdaspecificitásában. Pontos *Rhizobium* LPS szerkezetet még nem közöltek, a bioszintézisért felelős gének feltárása is kezdeti stádiumban van. Legtöbb információ a *R. leguminosarum*-mal folytatott vizsgálatokból gyűlt össze, melyből számos LPS mutánst izoláltak, térképeztek és segítségével *lps* géneket tartalmazó DNS szakaszokat azonosítottak (Cava és mtsai 1989). E gének szekvenciája és pontos funkciója azonban még ismeretlen.

### 1.5.3. Növény-baktérium kapcsolatban résztvevő szénhidrát szignálok

Növényi, gomba és baktérium eredetű oligoszacharidokról számos esetben kimutatták, hogy képesek kémiai szignálként hatni és specifikus növényi gének (pl. védekező mechanizmusban vagy differenciációban résztvevő gének) expresszióját aktiválni. Ezek az oligoszacharid szignálok önmagukban, fehérjékkel történő asszociáció nélkül hatnak, nem úgy, mint az állati vagy élesztő glükoprotein felismerő rendszerek (Hahn és Cheong 1991, Ryan 1987).

Gomba sejtfalból kiszabaduló oligoszacharidok fitoalexin felhalmozódást váltanak ki a növényi sejtekben. Ez a védekezési alapreakció a résztvevő enzimek *de novo* szintézise következtében válik lehetővé. Ilyen típusú oligoszacharid a *Phytophthora*-ban található hepta- $\beta$ -glükózid, ami 300 hasonló felépítésű molekula közül az egyedüli aktív. A jelenség igen specifikus receptor léteire enged következtetni (Darvill és Albersheim 1984).

Hasonló, védekezési mechanizmust beindító hatása van a növény saját sejtfalából külső behatásra (enzim, sav) felszabaduló oligoszacharidoknak is (pl.  $\alpha$ -1,4 oligogalakturonsav). Néhány esetben az oligoszacharidok növényi sejtek közötti, hormonokhoz hasonló jellegű szignál szerepét is kimutatták, melynek mechanizmusa ismeretlen (Hahn és Cheong 1991).

Nemrég derült fény arra, hogy növény-baktérium szimbiózis esetén is működik oligoszacharidokra alapuló kommunikáció. A *R. meliloti* baktériumok által előállított NodRm-1 nevű acilált glükózamin tetraszacharid specifikusan képes kiváltani a gazdanövényen gyökérszőr deformációt, ill. a gyökér kéregsejtjeinek az osztódását (Lerouge és mtsai 1990).

A *R. meliloti* *exoB* mutánsa is képes e szignálmolekula szintézisére, ugyanakkor egyik savas EPS-t sem szintetizálja, és az LPS-e is eltér a vad típusú baktériumétól. Ez arra utal, hogy a NodRm-1 bioszintézisének útja korán elválik az EPS és LPS bioszintézis utaktól.

A szimbiotikus gümő fejlődése során a NodRm-1-nél későbbi szakaszokban ható további baktérium szignálok szükségesek a növény számára. Ilyen szerepet tölthetnek be a baktérium sejtfelszíni poliszacharidjai.

#### 1.5.4. A bakteriális poliszacharidok szerepe a gümőfejlődésben

A savas EPS-ről számos kutatólaboratórium kimutatta, hogy a *R. meliloti* - lucerna, a *R. leguminosarum biovar viciae* - borsó és a *R. leguminosarum biovar trifolii* - here szimbiózis esetében nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a gümőfejlődés teljes egészében megtörténjen. Ezzel ellentétben a *R. fredii* - szója, ill. a *R. leguminosarum biovar phaseoli* - bab szimbiózis esetén az EPS<sup>-</sup> mutánsok teljesen effektív, Fix<sup>+</sup> gümőket képesek létrehozni (Gray és Rolfe 1990).

A két csoport közt szembeűnő különbség, hogy az előbbiek indeterminált gümőket, az utóbbiak determinált típusú gümőket hoznak létre gazdanövényükön. Nem ismeretes, hogy ez milyen befolyással van az EPS szimbiózis során betöltött szerepére. Azt azonban, hogy valamilyen kapcsolat van a gümőtípus és a *Rhizobium* sejtfelszíni poliszacharidok gümőfejlődésre gyakorolt hatása között az is jelzi, hogy eddigi ismereteink szerint az LPS a determinált típusú gümőt kialakító szimbiózisokban szükséges a gümőfejlődés során. A *R. leguminosarum biovar phaseoli* LPS<sup>-</sup> mutánsai nem képesek Fix<sup>+</sup> gümőket képezni a bab gyökerein, az

infekciós fonalak fejlődése és a merisztématikus aktivitás nagyon korán leáll (Gray és Rolfe 1990).

Az  $\text{Exo}^-$  *R. meliloti* mutánsokat kétféle módon sikerült komplementálni növényi testben. Az egyik eljárás során  $\text{Nod}^+ \text{Exo}^-$  és  $\text{Nod}^- \text{Exo}^+$  baktériumokkal együtt fertőzték a gazdanövényt (koinokuláció), a másikban a  $\text{Nod}^+ \text{Exo}^-$  törzshöz a vad típusú baktériumból ( $\text{Exo}^+$ ) tisztított EPS-t (vagy annak oligoszacharid fragmentjeit) keverve végezték a fertőzést. Mindkét esetben bizonyos százalékban  $\text{Fix}^+$  gümők jelentek meg a gazdanövények gyökerén, jelezve azt, hogy a gümőfejlődés további szakaszainak lejátszódásához vad típusú EPS szükséges, legalábbis az indeterminált típusú gümők esetében (Glazebrook és mtsai 1990).

Nemcsak az EPS jelenléte fontos, hanem annak az adott szimbiózisra jellemző pontos szerkezete is. A *R. meliloti* képes bizonyos körülmények között a szukcinoglükántól eltérő szerkezetű savas EPS (EPSII) termelésére is (7. ábra). Ez az EPS képes a szukcinoglükánt helyettesíteni, de csak a lucernával kialakuló szimbiózis során, a *R. meliloti* többi természetes gazdanövényén (*Melilotus*, *Trigonella*) csak az EPSI funkcionál, az EPSII nem (Glazebrook és Walker 1989).

Az *exoH* mutáns *R. meliloti* által termelt savas EPS-ről csak a szukcinát módosítás hiányzik (Leigh és mtsai 1987), egy másik *R. meliloti* mutáns (101.45) EPS-éről a piruvát módosítás (Müller és mtsai 1988), mégis mindkét törzs elveszti képességét a nitrogént kötő gümő kialakítására, azaz a gazdanövény nem ismeri fel a megváltozott EPS-t. Ezek az adatok valószínűsítik egy specifikus oligoszacharid-receptor felismerési szisztéma létezését, ami a különböző gazda-szimbionta esetében más és más lehet.

A *R. meliloti* 41 törzs egy spontán *exoB* mutáns származéka (AK631)  $\text{Fix}^+$  gümőt képez a lucernán, ellentétben az ugyanezen génben mutáns *R. meliloti* SU47 törzsszel, mely - mint bármely más  $\text{EPS}^-$  mutánsa -  $\text{Fix}^-$  gümőt alakít ki. A *R. meliloti* 41 tartalmaz egy *lpsZ* nevű gént, amely a SU47-ben nem expresszálódik vagy nincs meg (Williams és mtsai 1990). Ez a gén felelős egy módosult LPS molekula termeléséért, ami képes a savas EPS szerepét helyettesíteni. Ha *R. meliloti* 41-ből

átviszik az *IpsZ* gént egy *R. meliloti* SU47 Exo<sup>-</sup> Fix<sup>-</sup> mutánsba, a baktérium Fix<sup>+</sup> fenotípusúvá válik. Az *IpsZ* hatására létrejövő új LPS molekula felépítése ismeretlen.

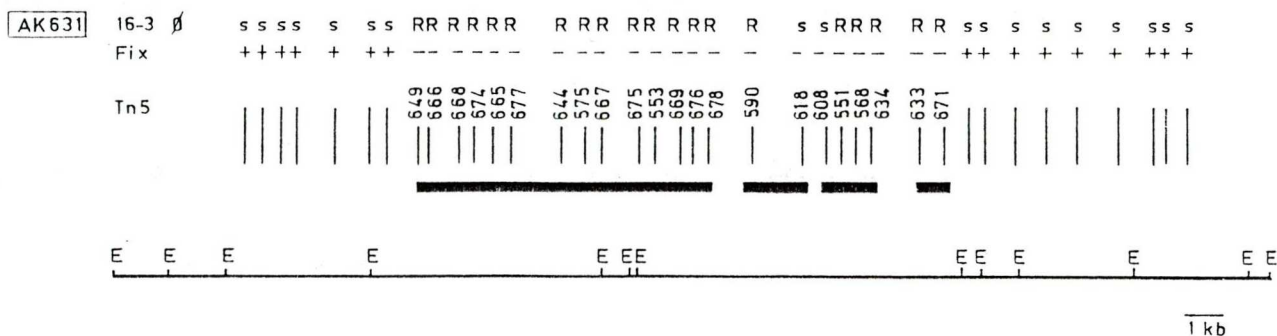
### **1.6. Az értekezés eredményeihez kiindulási alapul szolgáló előzmények: a *R. meliloti* 41 *fix-23* régiójának izolálása és kezdeti analízise**

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

A csoportban már korábban izolált Fix<sup>-</sup> *R. meliloti* mutánsokat Putnoky Péter és munkatársai csoportosították aszerint, hogy a szimbiózis a gümőfejlődés melyik stádiumában áll le az adott mutáció hatására (Putnoky és mtsai 1988). A legfontosabb megközelítések a mutáns gümők fény- és elektronmikroszkópos analízise, valamint a gümőben kifejeződő szimbiózis specifikus RNS populáció vizsgálata volt. Érdeklődésük elsősorban az általuk 1. csoportba sorolt mutánsok felé fordult, amelyek közös jellemzője, hogy a gümőkben nem expresszálódnak a leghemoglobin és nodulin-25 nevű szimbiózis specifikus növényi gének, valamint a baktérium *nifKDH* génjei sem fejeződnek ki, azaz a gümőfejlődés meglehetősen korai stádiumban leáll. Ennek egyik oka lehet az, hogy a növény nem kapja meg az adott szakaszban szükséges bakteriális szignált. Ily módon e mutánsok segítségével lehetőség nyílhat olyan bakteriális gének azonosítására, melyek a növény számára küldött, a Nod faktorra analóg, de későbbi stádiumban szükséges jel előállításában vesznek részt.

Felhasználva a korai stádiumú Fix<sup>-</sup> mutánsokat (1. csoport), *R. meliloti* génbankból komplementáció segítségével izoláltak négy különböző, *fix* géneket hordozó DNS szakaszt (Putnoky és mtsai 1988). Ezek közül legrészletesebben a *fix-23* jelű régiót jellemezték. Megállapították a régió térképhelyzetét a baktérium kromoszómáján, elkészítették fizikai térképét, elvégezték a helyspecifikus Tn5

mutagenézisét és a Tn5 mutációkat komplementációs egységekre csoportosították (8. ábra) (Putnoky és mtsai 1990).



**8. ábra.** A *fix-23* régió genetikai térképe. A függőleges vonalak a Tn5 inszerciók beépülési helyét jelzik, felettük az egyes inszerciók fenotípusát tüntettük fel. R = rezisztens, s = szenzitív a 16-3 fágra, (+) =  $\text{Fix}^+$ , (-) =  $\text{Fix}^-$ . A téglalapok a komplementációs egységek elrendeződését mutatják. Az ábra alján a régió *EcoRI* térképe látható.

Időközben kiderült, hogy a régióba térképezhető  $\text{Fix}^-$  mutációk egyben rezisztenciát okoznak a *R. meliloti* 41 specifikus bakteriofágjával, a 16-3 fággal szemben. E rezisztencia okának az bizonyult, hogy a *fix-23* mutáns baktériumok sejtfelszínén nem képesek megtapadni a fág-részecskék (Putnoky és mtsai 1990). A jelenség kézenfekvő magyarázata, hogy a fág receptora megváltozik vagy eltűnik a régióba történő Tn5 beépülések következtében. Ez esetben ez a struktúra, vagy ennek egy része játszhat szerepet a szimbiotikus gümőfejlődés során is.

A *R. meliloti* SU47 törzs  $\text{Exo}^-$  mutánsai egyben  $\text{Fix}^-$  fenotípusúak is. A *R. meliloti* 41 egy spontán *exoB* mutánsa, az AK631 azonban  $\text{Fix}^+$ , vagyis a *R. meliloti* 41 törzsben létezik valamilyen molekula, ami az *exo* mutánsban az EPS helyébe lép, annak szerepét a szimbiózis során átveszi.

A *fix-23* régióban lévő mutációk csak  $\text{Exo}^-$  baktérium törzsben (AK631) okoztak  $\text{Fix}^-$  fenotípust, az  $\text{Exo}^+$  *R. meliloti* 41-ben nem. A jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy az  $\text{Exo}^-$  AK631-ben az a struktúra pótolja az EPS szerepét, amit a *fix-23* régió határoz meg. Akkor tűnik csak el az adott szimbiotikus funkció, amikor az *exo* gének mellett a *fix-23* géneket is elrontjuk. 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 szimbiotikus gümőfejlődés során, a *R. meliloti* 41 minden vizsgált gazdanövényén (Putnoky és mtsai 1990).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat eredményeit képező munka megkezdésekor ismeretes volt, hogy a *R. meliloti* 41 baktérium törzs rendelkezik egy olyan géncsoporttal (*fix-23* régió), ami a szimbiotikus gümőfejlődésben, valamint a baktérium sejt felszínén történő fágtapadásban egyaránt szerepet játszik. Az is kiderült, hogy a *fix-23* régió képes az *exo* gének szimbiózis során betöltött funkcióját helyettesíteni.

Célul tűztük ki e géncsoport funkciójának vizsgálatát, a gének által meghatározott, valószínűleg a sejt felszínén elhelyezkedő struktúra felderítését. Elhatároztuk, hogy elvégezzük a régió legnagyobb komplementációs egységének DNS szekvencia analízisét, melynek ismeretében további információkat reméltünk az itt elhelyezkedő gének szerepéről.

A következő részfeladatok megoldása útján kívántuk elérni célunkat:

- A *fix-23* gének által meghatározott struktúra izolálása és kémiai jellegének meghatározása fágtapadási teszt segítségével.
- Az izolált struktúra tisztítása és kémiai természetének vizsgálata kromatográfiás módszerekkel.
- A *fix-23* régió 1. komplementációs egységét tartalmazó DNS szakasz szekvenciájának meghatározása.
- A szekvencia komputeres analízise útján a komplementációs egység felépítésének vizsgálata, a lehetséges kódoló nyitott leolvasási keretek (ORF-ek) azonosítása.
- Az azonosított, feltehetőleg kódoló ORF-ek fehérje termékeinek összehasonlítása adatbázisokban tárolt aminosav szekvenciákkal. A szignifikáns homológiát mutató fehérjék, illetve fehérjeszakaszok segíthetnek közelebb jutni a biokémiai funkciók megismeréséhez.
- A valószínű funkció ismeretében megvizsgáljuk, komplementálják-e a *fix-23* gének más szervezetek hasonló jellegű génekben hibás mutánsait.
- Különböző körülmények között Tn10LK fúziók felhasználásával vizsgáljuk a komplementációs egységet alkotó gének kifejeződését.



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok

A dolgozatban szereplő baktérium törzseket, bakteriofágokat és plazmidokat az 1. táblázatban tüntettük fel. A szekvencia analízis során használt szubklónokat, valamint a *fix23::Tn5* és a *fix23::Tn10LK* inszerciók elhelyezkedését a 13. ábrán mutatjuk be.

#### 1. táblázat. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok.

elnevezés	jellemzők	hivatkozás
<i>E. coli</i> törzsek		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) (F'<i>traD36 proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i>)</i>	Yanish-Perron és mtsai 1985
JF1754	<i>metB leuB hisB gal hsdR</i>	J. Friesen
L48	<i>fabD</i> (hőérzékeny)	B. Bachman, Yale Univ.USA
CY288	<i>fabBF</i> (hőérzékeny)	B. Bachman, Yale Univ.USA
CHK57	<i>nifA::lacZ</i>	Ditta és mtsai 1987
RKP9	<i>nifH::lacZ</i>	Szeto és mtsai 1987
PP211	JF1754 (pRK2013)	Putnoky P., Szeged

***R. meliloti* törzsek**

<i>R. meliloti</i> 41	vad típus, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , Exo <sup>+</sup>	Szende K., Budapest
AK631	<i>R. meliloti</i> 41 származék Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , Exo <sup>-</sup>	Kondorosi Á., Szeged
SU47	vad típus	Vincent 1941
<i>R. meliloti</i> 1021	Sm <sup>R</sup> SU47 származék	Meade és mtsai 1982
PP666	AK631 <i>fix23::Tn5</i>	Putnoky P., Szeged
PP674	"	"
PP665	"	"
PP644	"	"
PP667	"	"
PP675	"	"
PP669	"	"
PP678	"	"
PP976	AK631 <i>fix23::Tn10LK</i>	Putnoky P., Szeged
PP982	"	"
PP974	"	"
PP938	"	"
PP940	"	"

**Bakteriofágok**

16-3	<i>R. meliloti</i> 41 fág	Orosz L., Szeged
M12	<i>R. meliloti</i> 1021 fág	Finan és mtsai 1984
M12h1	M12 eltérő gazda- specifitású változata	Finan és mtsai 1984
M13 mp18/19	egyszálú fág vektor	Norrander és mtsai 1983
R408	pBS <sup>+</sup> / - helper fágja	Russel és mtsai 1986

## Plazmidok

pRK2013	Km <sup>R</sup> helper plazmid	Figurski és Helinski 1979
pBS <sup>+</sup> /-	Am <sup>R</sup>	Stratagene, USA
pUC 18/19	Am <sup>R</sup>	Yanish-Perron és mtsai 1985

## 3.2. Mikrobiológiai eljárások

Az *E. coli* törzseket LB tápközegben (Maniatis és mtsai 1982) 37 °C-on, a *R. meliloti* törzseket YTA tápközegben (Orosz és mtsai 1973) 32 °C-on növesztettük. Kivételt képeztek a hőérzékeny zsírsavsintézis mutáns *E. coli* törzsek, melyek tenyésztése 30 °C-on történt. A rezisztencia markert tartalmazó baktériumok tápközegét a 2. táblázatban feltüntetett értékeknek megfelelően antibiotikumokkal egészítettük ki.

**2. táblázat.** Az alkalmazott antibiotikumok végkoncentrációja.

Antibiotikum		<i>E. coli</i>	<i>R. meliloti</i>
tetraciklin	(Tc)	15 µg/ml	15 µg/ml
kanamicin	(Km)	30 "	200 "
streptomycin	(Sm)	100 "	200 "
ampicillin	(Am)	100 "	-

A *R. meliloti* törzsekbe a különböző plazmid konstrukciókat konjugációval, a háromszülős keresztezés módszerével juttattuk be (Ditta és mtsai 1980). A donor és recipiens, valamint a pRK2013 helper plazmidot tartalmazó (PP211) baktérium populációkat YTA táptalajon egyenlő arányban összekevertük, majd 8-12 órán át 32 °C-on inkubáltuk. A 0.9 % NaCl-ban felszuszpendált és hígított baktérium tömegből

megfelelő antibiotikumot tartalmazó szelektív táptalajon válogattuk ki a transzkonjugánsokat.

Az *E. coli* törzsekbe transzformáció segítségével vittünk be plazmidokat (Dagert és Ehrlich 1979). A logaritmusos növekedési szakaszban lévő sejteket ( $OD_{600}=0.2-0.4$ ) centrifugálással összegyűjtöttük, majd 50 mM  $CaCl_2$  oldatban inkubáltuk ( $0\text{ }^{\circ}C$ , 20 perc). Újabb centrifugálás után az eredeti térfogat egy tizedének megfelelő  $CaCl_2$  oldatban szuszpendáltuk fel a sejteket  $0\text{ }^{\circ}C$ -on. Az így előállított kompetens sejtekbe hősokk ( $42\text{ }^{\circ}C$ , 2 perc) alkalmazásával juttattuk be a DNS-t.

A *fix-23* mutáns *R. meliloti* törzsek autoagglutinációs tesztjét TY tápfolyadékban (Beringer 1975) végeztük. 3-4 napon át  $32\text{ }^{\circ}C$ -on rázatva inkubáltuk a tenyészeteket, majd néhány perc ülepítés után vizsgáltuk az autoagglutináció mértékét.

### 3.3. Sejtburrok és LPS izolálása és jellemzése

A baktérium sejtburrok izolálását a de Maagd és mtsai (1988) által kifejlesztett módszert követve végeztük. A centrifugálással összegyűjtött sejteket mostuk (10 mM  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ , 0.9 % NaCl, pH 7.4), majd 50 mM Trisben (pH 8.5) felvéve szonikáltuk (5x30 másodperc, 15 másodperces szünetekkel). Az épen maradt sejtek eltávolítása után 0.2 mg/ml lizozimmal kezeltük a felülúszót, majd 0.1 térfogat 2 M KCl oldatot adtunk az elegyhez. A membránfrakciót ultracentrifugálással gyűjtöttük össze (12 000 g, 60 perc).

Az LPS-t a forró fenolos eljárással extraháltuk (Westphal és Jann 1965). A vizes fázist desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd a kis molekulásúlyú szennyező anyagokat 4-6 órás, 100 000 g-vel történő ultracentrifugálással távolítottuk el. Az 1 liter logaritmusos fázisú baktérium tenyészetre vonatkoztatott LPS pellet mennyisége 0,7-2,3 mg volt.

Az LPS pellet további analízisére Noel és munkatársai (1986) módszerét alkalmaztuk. A vízben felvett majd fagyasztva szárított (liofilizált) anyagot feloldottuk (0,1 M EDTA, 0,3 M trietilamin), majd Sepharose 4B oszlopon eluáltuk 0,3 M

trietilaminban. A frakciók keto-deoxi-oktulonsav (KDO) tartalmát a tiobarbiturát módszerrel (Karkhanis és mtsai 1978), az összes cukor tartalmát a fenol-kénsav teszttel (Dubois és mtsai 1956) határoztuk meg.

A sejtburrok és LPS mintákból a fehérjekomponensek illetve szennyeződések eltávolítását proteináz-K emésztéssel végeztük (1 mg/ml, 60 °C, 90 perc), majd a proteináz-K-t inaktiváltuk (100 °C, 10 perc). A különböző sejtburrok és LPS minták  $\beta$ -glükozidáz és  $\beta$ -glükuronidáz kezelését 0,2 M Na-acetát pufferben (pH 5,0) végeztük (37 °C, 60 perc). Ugyanezen kezelés a poliszacharid bontó enzimek hiányában nem befolyásolta a minták fágmegkötő képességét.

A Sepharose 4B oszlopon elválasztott, KDO tartalmú első csúcs anyagát a következő módon analizáltuk. Az összegyűjtött mintát dialízis után liofilizáltuk, desztillált vízben feloldottuk, majd kloroformmal extraháltuk a szennyező lipideket. A vizes fázist gyenge savas hidrolízisnek vetettük alá (1 % ecetsav, 100 °C, 2 óra), ami lipid csapadék kiválását eredményezte. A csapadékot az LPS analízis szokásos módját követve tovább hidrolizáltuk (4 N sósav, 100 °C, 6 óra). A felszabadult zsírsavakat gázkromatográfiával detektáltuk (Russa és Lorkiewicz 1974).

A lipid kicsapás után maradt felülúszót liofilizáltuk, majd Sepharose 4B oszlopon az LPS mintákhoz hasonló módon kromatografáltuk.

A fáginaktivációs kísérleteket Lindberg (1967) valamint Hancock és Reeves (1976) módszerével végeztük. 100  $\mu$ l tesztoldatban (50 mM Tris, 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5) 1  $\mu$ l sejtburrok (vagy proteináz-K-val kezelt sejtburrok) preparátumot illetve 10  $\mu$ g LPS mintát inkubáltunk együtt  $10^5$  fágrészecskével (30 °C, 1-2 óra). Az inkubáció után szabadon maradt (nem megkötődött) fágrészecskéket AK631 törzsön titráltuk.

A fágmegkötés  $\text{Ca}^{2+}$ -függését ugyanezen rendszerben vizsgáltuk úgy, hogy az inkubáció során bizonyos időközönként 250 mM végkoncentrációban kétértékű kationokat kötő kelátképzőt (EDTA) adtunk a tesztoldathoz, majd a fent említett módon meghatároztuk a kivett mintákban a szabadon maradt fágrészecskék mennyiségét.

### 3.4. Rekombináns DNS technikák

A klónozási munkák során alkalmazott rutin eljárások nagy részét széles körben elterjedt receptek felhasználásával végeztük (Maniatis és mtsai 1982). A kereskedelmi forrásokból beszerzett enzimeket, izotópot és vegyszereket a gyártó cégek utasításait figyelembe véve alkalmaztuk.

A plazmid DNS-t 10-12 órán át növesztett sejtekből izoláltuk Ish-Horowicz és Burke (1981) módszere alapján. A 0.2 N NaOH, 1 % SDS segítségével történő feltárás után 0 °C-os Na-acetáttal (3 M, pH 4.8) csaptuk ki a lizált sejtanyagot. A csapadék eltávolítása után a felülúszóból 0 °C-os i-propanollal csaptuk ki a plazmid DNS-t, majd visszaoldás után etanollal újra kicsaptuk. Restriktációs enzimekkel történő ellenőrzéshez az 1.5 ml baktérium tenyészetből nyert plazmid DNS 1/10-1/100 részét használtuk.

Nagy mennyiségű plazmid DNS izolálása esetén 1 liter baktérium kultúrából indultunk ki, és az oldat térfogatok arányos növelésével az előbbiekben leírt módszert alkalmaztuk. Az így nyert DNS mintát CsCl grádiensen történő ultracentrifugálással tisztítottuk tovább (Maniatis és mtsai 1982).

A restriktációs emésztéseket és az agaróz gélelektroforézist a Maniatis és mtsai (1982) által leírtak alapján végeztük. Általában 1 % agaróz tartalmú gélen Tris-borát (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA, pH=8.0) vagy Tris-acetát (50 mM Tris, 20 mM acetát, 2 mM EDTA, 18mM NaCl, pH 8.0) puffer jelenlétében választottuk el a DNS mintákat. Ezután a géleket 0.5 mg/ml etídium-bromid oldatban áztatva festettük a DNS-t, majd UV fényel átvilágítva fényképeztük le.

DNS fragmenteket általában elektroelúcióval izoláltunk. Néhány mikrogramm megemésztett DNS minta agaróz gélelektroforézise után a kívánt fragmentet tartalmazó géldarabot kis energiájú (nagy hullámhosszú) UV fényben szikével kivágtuk. Dialízis hártában elektroforézissel kifuttattuk a DNS-t a géldarabból, majd fenollal és kloroformmal történő extrahálás után etanollal kicsaptuk a DNS fragmentet (Maniatis és mtsai 1982).

A kívánt klónok előállítását általában a tisztított, vízben oldott DNS fragment megfelelően emésztett vektorba ligálása, majd a ligátum kompetens sejtekbe transzformálása útján történt (Maniatis és mtsai 1982). A szekvencia analízis elvégzéséhez a fragmenteket M13 vagy pBS vektorokba építettük, in vitro transzkripció-transzlációhoz pUC vektort használtunk. A klónt tartalmazó transzformáns sejteket az adott vektortól függően vagy a megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajon, vagy Xgal és IPTG jelenlétében szín alapján szelektáltuk. A szubklónozást a 13./b ábra foglalja össze.

### 3.5. DNS szekvencia meghatározás

A szekvencia analízis elvégzése érdekében a kívánt DNS fragmenteket tartalmazó klónokból egyszálú (fág) DNS-t izoláltunk. Az így nyert templát DNS nukleotid sorrendjét a Sanger (1977) által kidolgozott dideoxi láncterminációs technikán alapuló módszerekkel határoztuk meg. A teljes folyamat elvégzése során (templát izolálás, szekvenálási reakciók, a termékek elektroforetikus elválasztása, autoradiográfia, értékelés) az "USB Corporation Sequence Protocols" kiadvány utasításait és tanácsait követtük. A klónok szekvenciáját 2-4 alkalommal határoztuk meg, minden felhasznált restrikciós hasítóhelyet átfedő klónokkal ellenőriztünk. A szekvencia GC gazdagsága miatt (az átlagos GC:AT arány 64:36) gyakori jelenség volt az aspecifikus termináció valamint az elektroforetikus kompresszió. Ennek feloldása érdekében a dGTP helyébe dITP-t tettünk a reakció elegybe, illetve 25 % formamidot tartalmazó poliakrilamid gélen választottuk el a reakció keveréket. Bizonyos esetekben a Sequenase enzimmel (módosított T7 polimeráz, USB) nehezen olvasható eredményt adó templátokat az "Amersham, BRL Extended Klenow" protokoll szerint szekvenáltuk. A kétféle polimeráz eltérő pozíciókban mutatott érzékenységet a GC gazdagság következtében kialakuló másodlagos szerkezetek létrejöttére, azaz az egyik enzimmel nehezen leolvasható szakasz a másikkal jól olvasható volt.

A pBS<sup>+/-</sup> (Stratagene) klónokból az R408 helper fág (Russel és mtsai 1986) segítségével lehet egyszálú DNS-ként izolálni az adott klónt. Néhány esetben a pBS<sup>-</sup> klónokból nem sikerült elegendő mennyiségű egyszálú DNS-t izolálni, ezeket a fragmenteket M13 vektorba klónoztuk át.

### 3.6. A DNS szekvencia adatok komputeres analízise

A komputeres analízist a PC/Gene mikrokomputer szoftver (Amos Bairoch, IntelliGenetics) és az UWGCG szekvencia analízis szoftver csomag (Devereux és mtsai 1984) segítségével végeztük. Az aminosav homológia keresésekhez a FASTA programot használtuk. A Swissprot és NBRF fehérje szekvencia adatbankokból gyűjtöttük ki az általunk feltételezett fehérjékhez hasonló polipeptideket.

### 3.7. A $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérése

A *lacZ* fúziót tartalmazó sejtekben az adott promoter aktivitásától függő mennyiségben termelődött  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérését Miller (1972) módszere alapján végeztük el. A mennyiségeket az Eppendorf cső térfogatához igazítottuk: 0.5 ml feltárt sejthez 0.5 ml Z-puffert adtunk (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.4  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol, pH 7.0), majd 0.2 ml ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -galakto-piranozid) szubsztrátot. Az időmérést röviddel a sárga szín megjelenése után (o-nitrofenol), még az enzim működésének lineáris szakaszában állítottuk le 0.5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást a mért optikai denzitás értékek alapján Miller egységekben számítottuk ki (Miller 1972).





## 4. EREDMÉNYEK

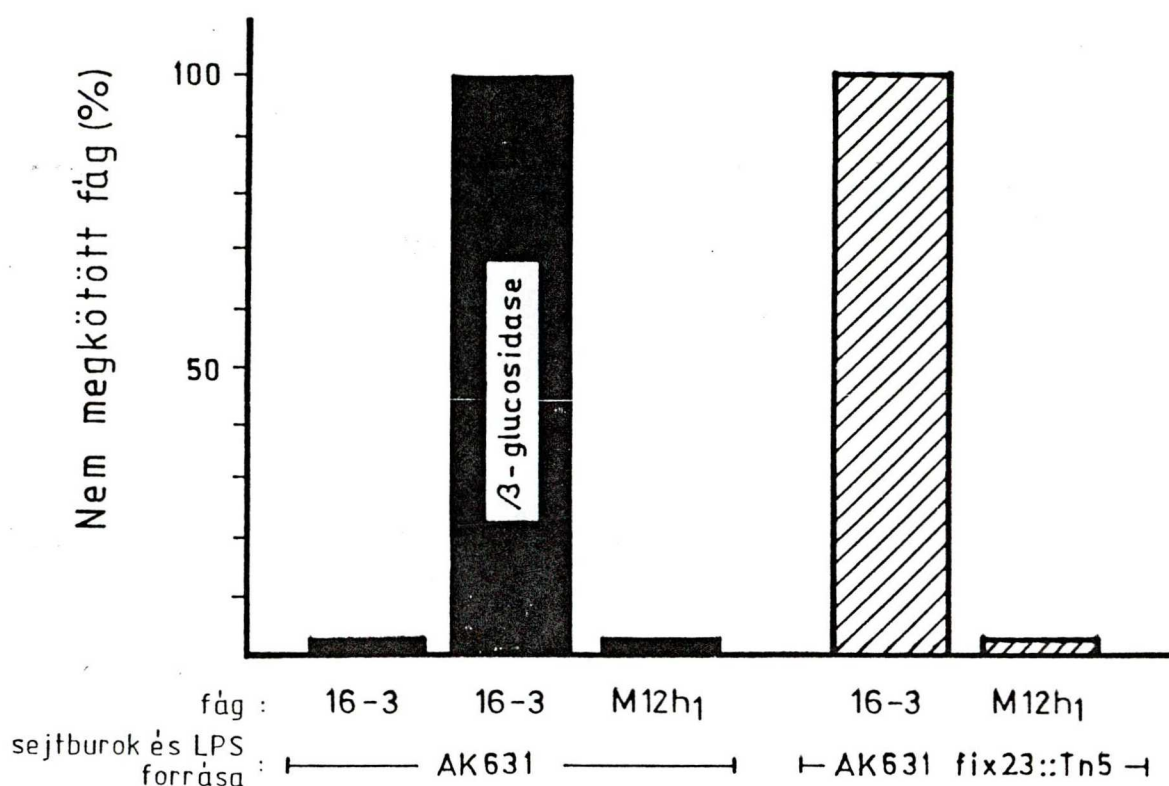
### 4.1. A *fix-23* gének által meghatározott struktúra analízise

#### 4.1.1. A baktérium sejtfelszín *In vitro* vizsgálata fágtapadási teszt segítségével

A *fix-23* régióban előállított mutációk hatására a 16-3 fág nem képes többé a felszínéhez tapadni. Ez a jelenség arra utal, hogy az általunk vizsgált *fix-23* géncsoport a baktériumsejt felszínén található struktúra felépítésében vesz részt. Valószínűnek tűnik, hogy ez a számos génből álló DNS szakasz valamilyen anyagcsereút lépéseire felelős, ami végeredményben ennek a fágreceptorként is szolgáló, és a gümőfejlődés folyamán is szükséges sejtfelszíni struktúrának a kialakulásához vezet. A struktúra azonosítása érdekében olyan megközelítést választottuk, melyben magát a 16-3 fágot használtuk fel, mint saját tapadási helyének leginkább specifikus indikátorát.

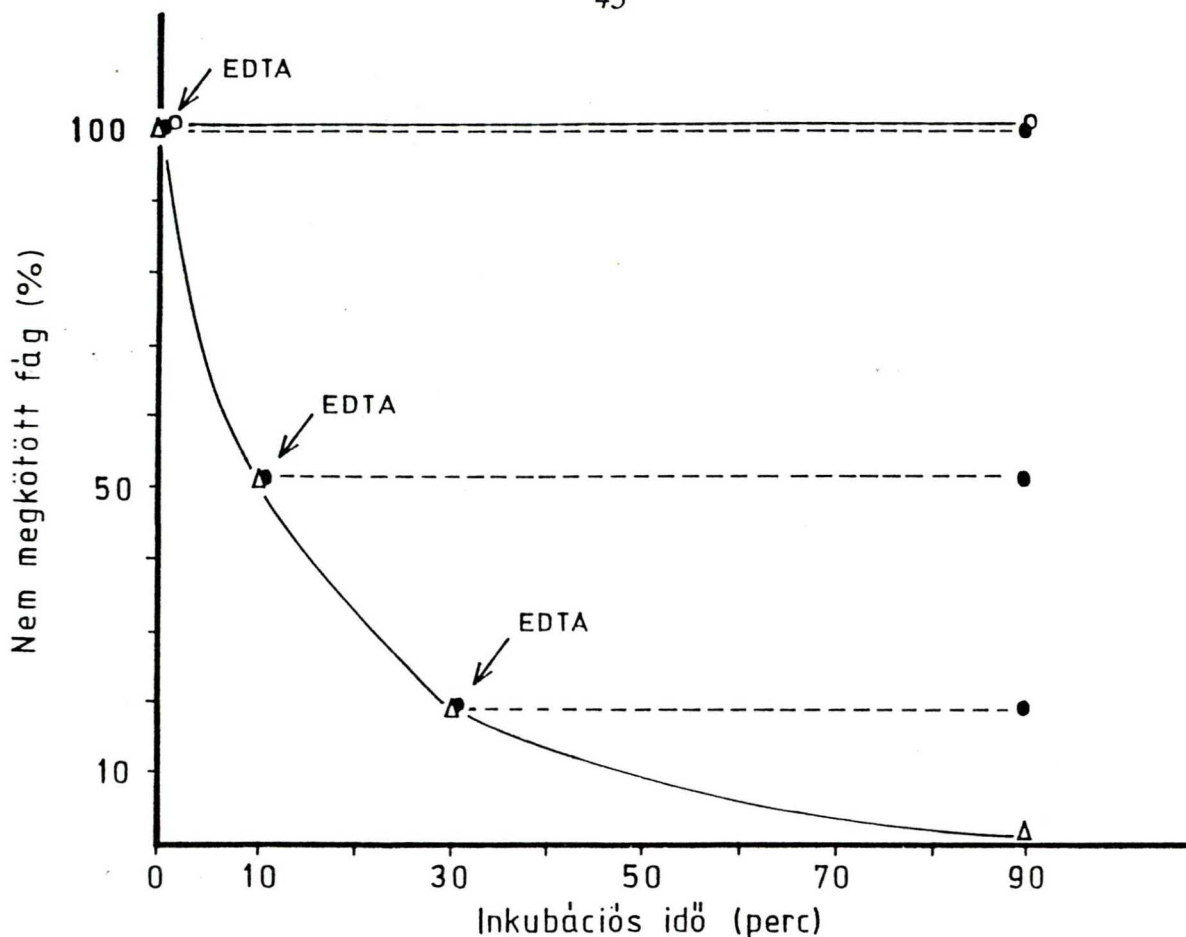
Izoláltuk a vad típusú és *fix-23* mutáns baktériumok sejtburkát (belső membrán, sejtfal, külső membrán), és különböző körülmények között fágtapadási (fáginaktiválási) tesztben vizsgáltuk. A teszt lényege a következő: a fág receptorát tartalmazó izolált sejtburokkal együtt inkubálunk ismert mennyiségű fág részecskét. Ezek - a megfelelő körülmények között - stabilan megtapadnak a receptor molekulákon (inaktiválódnak). A szabadon maradt fágok mennyisége titrálással gazdabaktérium pázsiton meghatározható.

A vad típusú sejtburok - hasonlóan az élő sejtekhez - a 16-3 fág részecskék 99 %-át megkötötte, míg a *fix-23* mutánsok gyakorlatilag nem mutattak fágkötést. A kontrollként használt M12h<sub>1</sub> jelű fágot, mely a vad típusú és *fix-23* mutáns baktériumokon egyaránt megtapad, a mutáns sejtburok preparátum is megkötötte, jelezve ezzel a kötődés specifikus voltát (9. ábra).



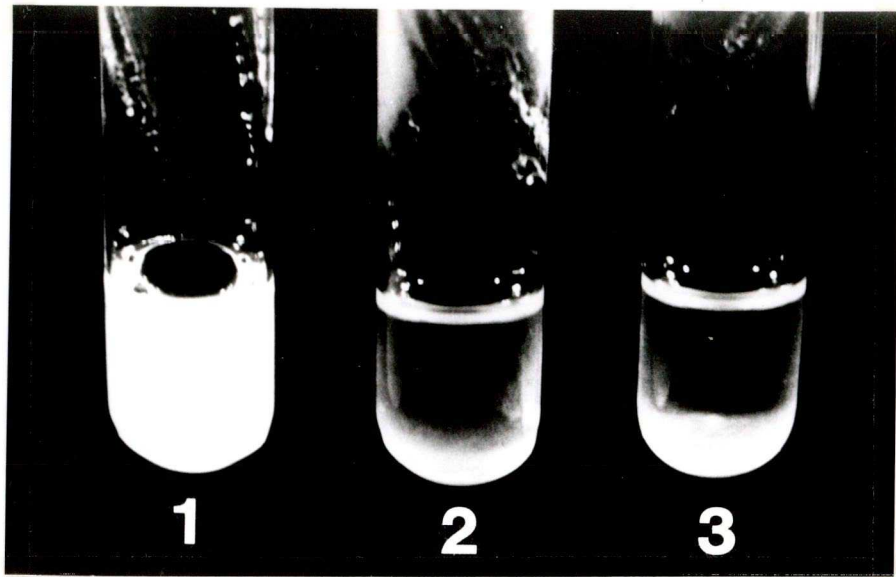
**9. ábra.** Sejtburrok és LPS minták fágkötési aktivitása. A vad típusú (fekete oszlop) és mutáns (sávos oszlop) minták fágtapadási tesztekben mutatott 16-3 illetve M12h<sub>1</sub> fágreszecskeket megkötő aktivitását a megfelelő oszlopok magassága jelzi. A minta enzimes kezelését az ábrán feltüntettük.

Megvizsgáltuk a fágkötés kinetikáját a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció függvényében. Kiderült, hogy a 0-100 mM tartományban a receptorhoz tapadó fágok száma arányos a jelenlévő  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségével. (10. ábra). Amikor kétértékű kationokat megkötő, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot a rendszerből eltávolítani képes kelátképzőt (EDTA) adtunk a tesztoldathoz különböző időpontokban, a fágreszecskek további megtapadása minden esetben leállt (10. ábra). Kinetikai vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a 16-3 fág megkötődésében - hasonlóan a mások által korábban leírt LPS receptorú fágokhoz (Takeda és Uetake 1973) - a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok alapvető szerepet játszanak.



**10. ábra.** Az EDTA hatása a fágkötődésre. A fágtapadási tesztből az inkubálás folyamán adott időpontokban egy-egy résztérfigatot eltávolítottuk, és EDTA hozzáadása után tovább inkubáltuk. A grafikon az eredeti és az EDTA kezelt mintákban a jelzett időpontokban szabadon maradt (nem megkötődő) fágok mennyiségét ábrázolja. Az EDTA hozzáadása az inkubáció bármely szakaszában megakadályozta a fágok további megtapadását receptorukon. Háromszög és folyamatos vonal = fágtapadás a standard tesztoldatban, fekete kör és szaggatott vonal = fágtapadás EDTA hozzáadása után, üres kör és folyamatos vonal = a mutáns baktériumból izolált sejtburkot vagy LPS-t tartalmazó kontroll.

E feltételezésünk egy független ellenőrzési lehetősége az ún. autoagglutinációs teszt elvégzése volt, melyet elterjedten alkalmaznak LPS mutánsok kiválogatásakor és jellemzésekor (Prier 1989). A vad típusú baktérium folyadék kultúra 3 nap inkubálás után is szuszpenzió maradt, ellentétben a *fix-23* mutánsokkal, melyek a sejtfelszíni töltésmegváltozás miatt történő spontán összecsapódás következtében kiüledtek a kémcső aljára (11. ábra).



**11. ábra.** A *fix-23* régióban mutáns baktérium sejtek autoagglutinációja. A = AK631, B = AK631 *fix-23::Tn5(553)*, C = AK631 *fix-23::Tn5(671)*.

#### 4.1.2. A sejt felszíni struktúra kémiai természetének vizsgálata

A fágkötés mértékét a sejtburkok előzetes proteináz-K kezelése nem befolyásolta. Poliszacharid emésztő enzim (pl.  $\beta$ -glükózidáz) alkalmazása esetén azonban a fág részecskék megkötődése drasztikusan lecsökkent (9. ábra). Hasonlóképpen megszüntette a vad sejtburkok fágkötő képességét a 100 °C-on történő detergens (SDS) kezelés.

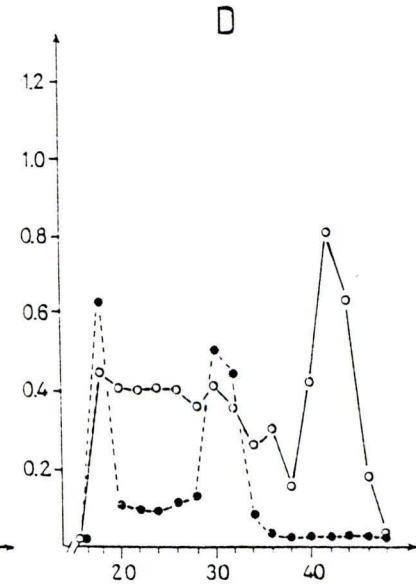
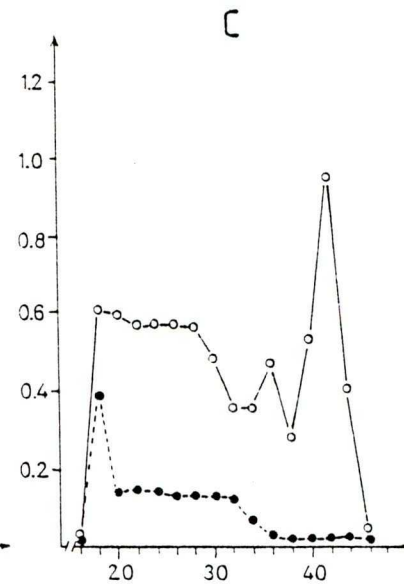
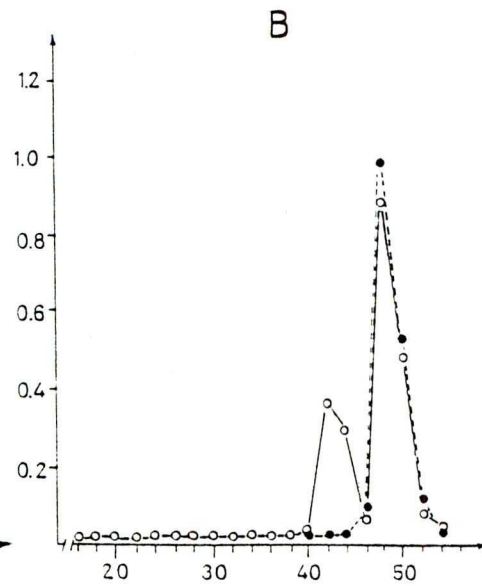
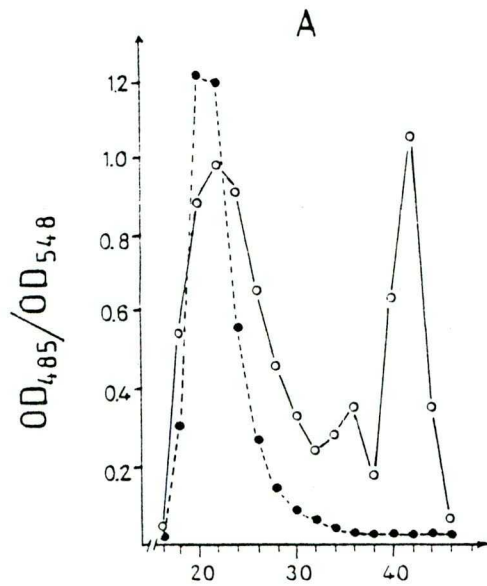
A proteináz-K-val emésztett sejtburkok durva LPS preparátumnak tekinthető, gyors LPS tesztekhez elterjedten alkalmazzák ezt az izolálási módszert (de Maagd és mtsai 1989). Pontosabb vizsgálatokhoz azonban a forró fenolos sejtextrakción alapuló LPS izolálás szükséges (Westphal és Jann 1965). Az ezzel a módszerrel a vad típusú és *fix-23* mutáns baktériumokból kivont LPS preparátumokat használva fágkötési tesztben hasonló eredményeket kaptunk, mint a sejtburkok ill. proteináz-K-val kezelt sejtburkok (azaz durva LPS kivonat) alkalmazása esetén (9. ábra). A poliszacharid bontó enzim kezelés hatása is ugyanolyannak bizonyult, a vad típusú baktériumokból kivont LPS  $\beta$ -glükózidáz emésztés után már nem képes megkötni a

fágokat. Az M12h<sub>1</sub> fágreszecskeket a vad és a *fix-23* mutáns baktériumokból extrahált LPS is megkötötte, bizonyítva ezzel a fágkötés specificitását.

A forró fenolos extrakcióval kivont preparátum természetesen nem tisztán LPS molekulákat tartalmaz, csak erősen feldúsul az extrakció folyamán az LPS mennyisége. Pontosabb analízis céljából elvégeztük az LPS preparátumok molekula méret alapján történő szétválasztását gélszűrési kromatográfia segítségével. A Sepharose 4B oszlopról szedett frakciókat cukor- és KDO-tartalom szempontjából vizsgáltuk. A vad típusú extraktban két meghatározó, nagy összcukortartalmú csúcs vált el egymástól, ezek közül a nagyobb molekulású bizonyult LPS-nek magas KDO tartalma alapján. A mutáns extrakt esetén ez a KDO tartalmú csúcs szembetűnően megváltozott lefutású és magasságú volt, mutánsokként eltérő képet mutatva. A KDO-t nem tartalmazó poliszacharid csúcs lefutása a mutánsokban nem változott (12. ábra).

A KDO tartalmú csúcs anyagát összegyűjtöttük, liofilizáltuk, majd tovább analizáltuk. Miután szerves oldószeres extrahálással eltávolítottuk a szabad zsírokat, gyenge savas hidrolízist végeztünk, ami a vizes oldatból kiváló csapadék keletkezését eredményezte. A csapadékot elkülönítettük, majd olyan további hidrolízisnek vetettük alá, ami zsírsavak szabadná tételére alkalmas (Russa és Lorkiewicz 1974). Az anyagot észterifikáltuk, majd vékonyréteg- és gázkromatográfias vizsgálattal különböző zsírsavak jelenlétét detektáltuk.

**12. ábra.** Forró fenolos extraktumok Sepharose 4B kromatogramjai. A = AK631, B = AK631 extraktum 1. csúcsának anyaga a lipid rész savas hidrolízissel történő eltávolítása után, C = AK631 *fix-23::Tn5*(553), D = AK631 *fix-23::Tn5*(671). 15 mg extraktot kromatografáltunk 1 x 62 cm oszlopon 300 mM trietilaminnal. 1,2 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A kék dextrán kontroll a 18. számú frakciótól jelent meg, a glükóz a 104. frakcióban eluálódott. Fekete kör = KDO tartalom (OD<sub>548</sub>), fehér kör = összcukor tartalom (OD<sub>485</sub>).



frakció szám



A gyenge savas hidrolízis után vizes oldatban maradt anyagot Sepharose 4B oszlopon frakcionáltuk. A vad típusú forró fenolos extraktra jellemző 1. csúcs eltűnt, és egy alacsonyabb molekulásúlyú, az 1. csúcshoz hasonló KDO tartalmú új poliszacharid csúcs jelent meg. Ez arra enged következtetni, hogy az eredeti KDO tartalmú poliszacharid csúcs (1. csúcs) gyenge savas hidrolízissel lipid és poliszacharid részre bontható (12. ábra). Az 1. csúcs tehát LPS jellegű molekulákat tartalmaz, ami tovább erősíti azt a hipotézisünket, hogy a *fix-23* gének egy LPS-szerű struktúra meghatározásában játszanak szerepet.

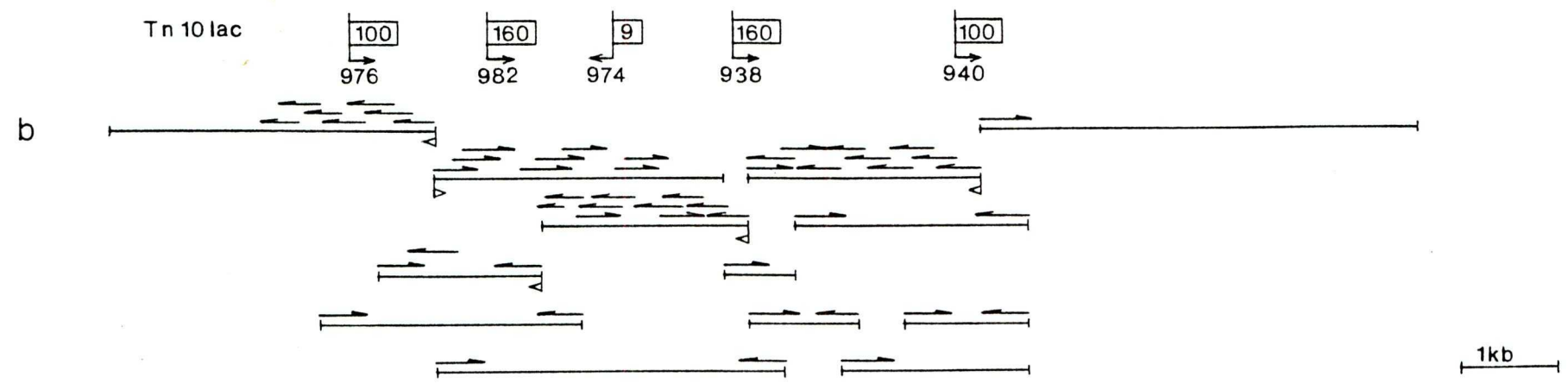
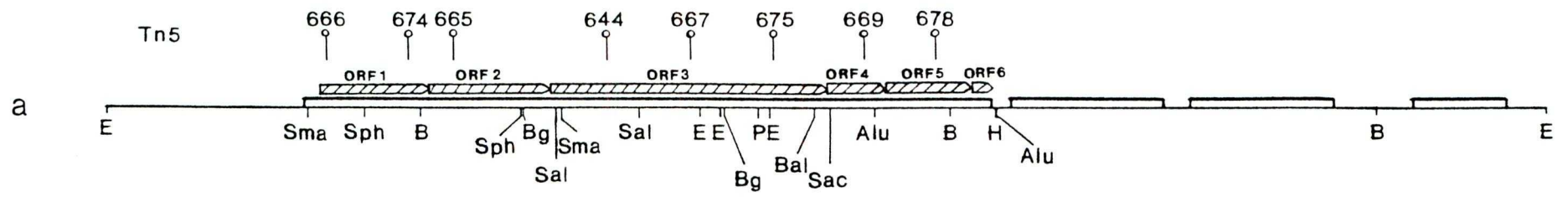
## 4.2. A *fix-23* régió 1. komplementációs egységét képező DNS szakasz szerkezetének és működésének vizsgálata

### 4.2.1. A *fix-23* régió 1. komplementációs egységét alkotó gének szubklónozása és szekvencia analízise

A szekvenálható DNS szakaszt a 13/b. ábrán látható módon 13 szubklónnal fedtük át. Ezek közül 5 szubklónból *ExoIII* kezeléssel deléciósort állítottunk elő, néhány esetben pedig további restrikciós helyek felhasználásával a szekvencia analízishez alkalmas kisebb szubklónokat készítettünk. A pBS<sup>-</sup>

**13. ábra.** A *fix-23* régió 1. komplementációs egységének szerveződése és a szekvencia analízis stratégiája. **a.** Az üres téglalapok a komplementációs egységeket, a nyílheggyel ellátott sávok a feltételezett kódoló ORF-eket és átírási irányukat jelzik. A klónozás során használt restrikciós hasítóhelyeket feltüntettük. Az ábra felső részén látható függőleges vonalak a Tn5 beépülési helyeket szimbolizálják. A bekeretezett számok az adott helyekre épült, nyíllal jelzett irányú Tn10LK fúziók aktivitását mutatják Miller egységekben.

Alu = *AluI*, Bal = *BalI*, B = *BamHI*, Bg = *BglII*, E = *EcoRI*, H = *HindIII*, P = *PstI*, Sac = *SacI*, Sal = *Sall*, Sma = *SmaI*, Sph = *SphI* **b.** Az 1. komplementációs egység szubklónozási és szekvenálási stratégiája. Az egyes klónok végpontjánál látható üres háromszög jelek az *ExoIII* kezelés helyét és irányát jelzik. A nyilak a szekvenált szubklónok méretét és a szekvenálási irányt mutatják.





vektorban készült klónokból általában nem volt kielégítő a tisztított egyszálú DNS mennyisége, ezért ezeket a fragmenteket M13-ba klónoztuk át. A szubklónozási munka egy jó részét Putnok Péter végezte, ezért ezt nem ismertetem részletesen.

A DNS szekvencia analízist alapvetően a Sanger féle dideoxi láncterminációs módszerrel végeztük. A valószínű fehérje kódoló szakaszokat három, eltérő elvi alapon működő komputer program segítségével kerestük. Az analízisek alapján hat nyitott leolvasási keret (ORF) valószínűsíthető, melyek mindegyike balról jobbra íródik át (13/a. ábra). *R. meliloti* kodon használati táblázatot szerkesztettünk korábban közölt *R. meliloti* gének szekvenciáját alapul véve. Ennek segítségével megállapítható volt, hogy a valószínűleg fehérjét kódoló ORF-ekben a kodon használat hasonló a már ismert *R. meliloti* génekben meglévőhöz. Az *E. coli* konszenzus szekvenciát alapul véve az ORF-ek előtt megkerestük a lehetséges riboszóma kötő helyeket. Az ORF1 előtt a megfelelő pozícióban az *E. coli* promoter konszenzushoz hasonló szekvenciát találtunk (-35 és -10 régió) (14. ábra). A többi ORF előtt ilyen szekvencia nincs, ami arra enged következtetni, hogy a hat ORF (gén) egy transzkripciós egységbe (operon) rendeződött. Az egyes feltételezett fehérje termékek számított molekulásúlya az átírás szerinti sorrendben: 39061, 42072, 103516, 20292, 29999, 9587 kDa. A pUC vektorokba épített ORF1-ről kimutattuk egy kb. 38 kDa fehérje termék megnyilvánulását in vitro transzkripciós- transzlációs kísérletekben.

**14. ábra.** A *fix-23* régió 1.komplementációs csoportjának nukleotid szekvenciája. A feltételezett kódoló régiók felett feltüntettük a következtetett aminosav sorrendet (egy betűs kód) is. A lehetséges riboszóma kötőhelyeket és promoter szekvencia elemeket aláhúztuk. A csillag stop kodont jelképez. A közölt nukleotid szekvencia X64131 jelzés alatt hozzáférhető az EMBL adatbankban.

GGGATAAACACGGGGGATACCCGCGAGAGCAGGAATGTCGCCGATTCGAATTTACGTTAGACCTTCAATGGGCTAAGACAATTTAACGGCAGTTTACAGGGCTTCGATCTTACATGACGG 120  
TAAATCAATAGGGCTGCATGCCTTGCCTCCGGAGCGAAATCTCCGAGGGCGCTTCAAAATCCTTCGTCAGGGCAAGTGCACCGTGGACCCCGCTCCCTTCGACCCGCTGGGACCTT 140  
CGCGTTTCTGGCACCGGTCATGGGCACCGCCGGCAAGACCTATTGCTTTCGCGCGGCTCCTCGACCATATCTACGATTTTCGATCCCGCGCTTTTCGGATGTCGACCGCGAGGCC 170  
TGATATGGACCGCAGCAGCGGGTCTGTTCGACGCTCGCCTGGCAGCGCTCGAGGACCGCAATATTTCCGTGGCGTCTGCTGCACCGTGAAATGTCGGCGCTATGTCGGCGCTCC 480  
CCTCGACCGCAATGCTGACGGTCAAGATCGGCTCGCGCGGCGCTACTCTCATGACGGGCAATACGCTGTGATCGTCTCAACCGTATTTCCACGCTTCGGCCTGAGCGGC 600  
GAGCATGACCGTCGACACGGCCTGTTCTCTTCTCGCTCGTGGCCCTCGATCAGCGCATGCGGGCGCTGAACCGCGGAGAGATCGACACGGCCATCGTGGCGCGCTCAATATCTCGCC 720  
ACCGCTTCCTTCGTCGCTTCGCCAGGGCGCATGCTCTGCCCGAAGGGCTCTGCCCGCCTATGACAAATGACGGCGCGGCTATGTCGGCGGAGGGCGCGCTCGTCTTCGT 840  
TGGCCCGACGGACCGGGCAACCGGAGCGCGCAGCGGAGCTATGCCCGATCGTGGCTCGCGCTCAATTCGGCGGGCGCACCAACGGCATCTCGCTGCCCTGGCGGAGCGCGAG 960  
CAATCTGCTGAGGATGATCTACGAGCGCAACGGCATCGACGCCAACCGGTTCGCTTCGAGAAGGCCATGGTACCGGCACGAAGGTTCGGCGACCCGGCGGAGGTCTGGTCTCATCGGC 1080  
GGTGTGCGCGCAAGCGGGCTCGGTGCCGATCGGCTCGATAAAGTCCAAATACGGCCATCCGAGCGGGCTCGCGCTGTTCGGGATGATGAAGCGGTTCGGCTCTGGAGAAC 1200  
TTATCTGGCGGCTCGCTGCATTCGAGACGCCAAGCGCAGATCGACTCGACGGCCTCAATGTCGCTGTGACTGCCAATCCGATCGAGCTCTGAAGGGCAAGCGGGCGGGCTC 1320  
CGGCATTAATCTTCGCTTCGGCGCGCAACGCCCATGTCGTTCATCAGCGATCGGATCGGCACAGCGGAAAGGATGCGACTCGCGGGCGGGCCAGCTGTTCTGGCAAAC 1440  
CCATACCGCGTGCAGCCTCGAAAACCTGCTCGAGAGACTATAAGCCCGCTTTCGGCGCGGACGAAGGAAGAGACGCGCGCATCGTCCGCGCTCGGCGCAATCGGACGCATATG 1560  
CCATCGGTTCGGCGCGCGCAGCGCATCTCCGAAGATATCGTCCGGCGGATTCGCAACCACTGGAAAACCCGGCTCCGATATCGGGGAGCGGGCGAAGCGGCCGCAAGAAGCA 1680  
AGTGCCTTCGCTCTTCGGCAACCGCTGCAATGGGCGGCATGGGTGTCGAGGCTTCGCGAGAAATTCGACTTCGTCAGTGTCACTTCGGTCAGCGCCCTTTTCAGGTT 1800  
TTCCGGATATCGTCTCACCGATCTCTGACCGACCCGGACTCGACAGGAAGCTCGCGGATACGAAGGTGGCCAGCGCTGCTTTTCGGATACAGGGCGCGCTCTCGACTCGCT 1920  
TGGCATGGGCACTAAGCGCAGCGCGTCTTCGTCATTCGGTCGCGAAATCGCTGGCGTATGACAGCGGGGGCGCTGTGCTCGTCGACCGCGTGTGATCGTCCGCAACGATCG 2040  
TGCACGAGACTTTCGGCGCGCAGGGCAGATGGCGCGGTATGCTGGCGAGGAGGACGCAAGGCTTCGCGGGGAGCGCGGTTCGACGATGTCGCTCGCAGCAATCAAC 2160  
TCACAAATTCGGTACGATCTCGCGCCGGCGAACGAGATTCGGCGTTCGCGACGCTGCGCGCAAGGCGAAAATCCGGTTCGATCTCGACATCAATATCGTTCACCAATCCG 2280  
TCATCGACCGGGCAAGAGGGCTTCTCTCGATATCCGTGATATCGCCCGCGCGGACGGAGCTGGCTATCTGTGACCGTCAGGGTGGCGGCTCGACGGACTGCTCTCGAT 2400  
CGACTCTGGTGAAGACGTCGCGAGCGCTGGTTCAGGGCGCTGCGAGGGCGCGCTCGATCTCGGCTCATGCTGTCTCATCGAGATCTCGCGGCTCGATCTTGGCTCC 2520  
CGTCAAGGAGAGATCAAGCAGCGCGGAGTGGCGGCTTCGGTGGTGGCGACTTGTGCGCGACGCGCGGCAACGGCCACGATCGATCTCGCGTGTGGCGCGCAGTCCGC 2640  
CGGTGGCGCGTCGACCGGTTCGCTGTCTATGGCAAGCGGGACGATTCATCGAATCCCGCGCTGCTTCGAGCGGTGGAACTGCGCGCGGGCGATGACCGATGCGACGGATC 2760  
CTTCGAGCTTCGCAAGGCCCTATCGGCTCAACGGCTGGCGCGCGACCCAAATGGGGAAAGCTGGAAAACCAATGTCGACCGGCTCTCTCCGGATCTCGCGCAACCGTGGT 2880  
CGGCAAGCGCATCTCCGGGCGAGCGTTCATCGAAAATCGCGTTCGCGCGCCAGCAATACGCGCAGCGGATCGAGGTTCGAGATCACCAATTCGGAGATCGTCCCGCGCTCGAA 3000  
TGCAGCAGCGCATCATGAACTCTGACCATCTGTGCGCGGAGCGCGGACATCGAGATCGGATCGCGCAACCTCTCTGGAAAGCGATTCGAGCGTGCATGCCGTTCGCGGA 3120  
CCGCAAGCCCTTCCGACGACGAGCAACGATCTGCTCCACCAAGGCTTGGCGAAGCGGGACCGTTCGCGCGGCAAGGCTTGAAGCGGCAAGCGTTCGGGCTGGACTAC 3240  
CCGCAATTCAGCTTCTCTCAAGCGCGTGGCTATGGCGACCGGCTTACGACGTCGATGAAAGCACCCAGGGCTCGGGGCAACCCCGTCACTTCGCGCTTCATCGGATC 3360  
GGTGCAGCGGACTTCCACGGCTGGTGCCTCTTCGACCGCTTACCAGCGCAGGGCGCGCGCTATATTCGTCGCTTCGGCTCGTGGCGTGTCAATGCCGCGCGCG 3480  
CGCGCGCGCGAGATCGAGATCGAGCGGGTCAAGCGCAACTCGATCAAGGACCGGTCCAATTTCTTCGACGAGACCGCGTTCGCGATCGACACTTCGAGGATTCGCGCTTCGCGGT 3600  
CTATCTGGCAAGCAAGACGCTTGAAGGCTTTCCTTCCACTATGAGGACGTCGTGTCGCGGTCGTCGCGCGCACGAAAGTTCGACGGCCATGCTTCGCGACCTGGCGGAG 3720  
GATCGATGCAATGGCGTTCGCAACCGGACCTGCTCTCAACCGCGCATCTACCGCGCTCCAGGAAATTCGCTGAAAGTTCGCGAGGGGACCGCCACAGTTCGAGGCGGACCGG 3840  
GCGCGGGACTTCGCTTCGAGTCTCTGACGAGCTGCTGCTGACGCTCGAGGATGCGCGCTTTCGAGCACCAGAACGGCAACTTCGAAAGTTCGCGACGGGAGTCTCGCTTCG 3960  
CGTTCGGGATCTTGGCGAGCTTATGGCGACCGCGCGATCGTGGGTGGAAGCGGTGCTCGTCAACAACCGCTATGCGGAAGCACTCAGCGTCTCGACCGCTGCTTGGGCG 4080  
GCTGACGGCGACGACCGGCTTGTCAATGCCGTTTCATCAGCGAAGCGACGCTCGACCATCAGGCGGTGCTTCGTCGGAGCGCGTTCGCGCATGGACAGGTGCTTCATACG 4200  
CGAACCGTTCGCTGCGCGCGCGGACCGCGCTCGGCTCATGAACTCGGCGCGTTCGGCTTCAGCGCGCGCTGGCGATCTGGCAGCGCGCAATGGTGCAGCATTTCCA 4320  
TTGAGCGCGGACAAATGCAACAGGAACTCGAAATTCGCTTTCGAGGAGTGAATGTGCGCTTCGAGAAAGAGCGAATTCGCGGATTCGGCGGTTCGACCTCGCGCTCAGT 4440  
TTCCGCAATCTCTCCAGCTGATCGAAGGAGGAGCGCGCTCCGACGGCCCTTCGCTCATGCCCGCGGAAAGCGGCTCGTGGCGCGCTCAGCGCGCGTGTCTTCGCGGAT 4560  
CGCCTGGTCTCTCGCGCGGATGGTTCGAGCGCAGCGAGCGGCAATTCGCGATCGCGAGGATCGCGGCGTACCCATGGCAGAGTGTCTCGCAGATCTCGACCTCGCGGAC 4680  
GGTGTGACGGATCGCAATCGCGCATGGGAACCAATCTGATCGAGGCGCGGGCAGCGGCGCGCGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 4800  
GACTGCCACTGCCGAAACGGTTCGCGCGCGTGGAAAGGATGCGCTCCCGTCCGTGTCGACGGCGACCTTGGCGAGATGGCGACGCTCCGCGAGCGCTCGAAGCATTGGG 4920  
CAGACGTTGCGCGCGTTCATGTCGAGGGCGGAGCGCGCTCGCGCAGGTTTCGCGCTGTCGACGCGGTGATTCGGCGTTCAGCGCTTCGCGAGGATGAAACAGCAT 5040  
CGCGCGCTCGAGCGGAGGGCGAGCGCGCGGCTTGTGCTGTCGCGCGCGGCGCGCTCCCTATCACTCGGCGGCTCGGGCTGAATTCGGATGTTGGGCTTCGCGCGG 5160  
CTTCAGAACGAGTATGAGTTTATCGACGTTACACGCTCGATCTTGGCGGATGCGGACATCGGCGCAAGGATGCTTCGCGAGCGCTTCCTGCTGAGGTTTCGGGACAG 5280  
CCGGAAATGGTGTTCGACCGGAAAGCGGCTGCTGTCGGAGCTTCGGCGTACCGGCGCAACGAACAAGGTTCAGGGAAACCAACCGCTTCGCGCGCGGACCATTCGCCAG 5400  
CGTCACTCGCAGGTTCGAAGCATCGCTGGAAAGAGCGGAGCGTACCGGAGCGGGCCCAACGAGGTCGTGTTGCCGTTCGCGGAAACCGGCTGAATTCGCGCGAGTGTGG 5520  
CATGGCTGTTCGCGGAAAGAGCGTTCGAAAGCGGTTTCGCGGGCAACCATCGGATGAACTTCCGGCGCGGCTGTCGCGGTTCGCGGAGAGATTCGAGATCTCGCGTTCGCG 5640  
GCGGTGATGGCATCGCTCCGCGGCTTTCGACCAATGCGGTCGTGCGCGCGCGCATCGCCAAGTCCGCGAGCGTTCGAGCGGTCGCGCGGCGGCAATTCGCGGTTCGCTCC 5760  
ACCGCTACTCGCATGTCGAGCTCGCGGCAATCAGGCTGGAGAGCAGATTTGATCCACGGTGGCTTCGCGCGGCTCGGCTTCCCGCGCTCAGGTCGCAAGCTCAAGGGCG 5880  
AAGGTCATCGCCACGGCGGAAAGCGCGAAAGCGCGGCTCTTTCGACGATGCTTCGCGCGGACCATCTCTCGATTTCGCTTCGCTCGCTTCGTCGAGGATTCGCTTCGCGTCCG 6000  
GGGAGGGCGTTCGACCTCGTCAATTCGCTTTTCGCGGAAGCGATGGAGCAGGCTCTCGCTGGTGAACCTTTCGGCGGTTCGGAAGCTCGGCAAGCGGACTATTACGCG 6120  
AGCAAGATCGGGCTCAGGGCTTCGCGCGCAATGTCAGCTATTCGGCATCGACGCGCATCAGTTCGCTGGTGAATGCGCGGATCTGACCAAGCGGCACTTCATCGAGATCGGAGCGC 6240  
TCGAGGAAGGCAACGTCAGCGCTTCCTATCGCGCTTCGATTACGGATGAAATCGGCAACTTTCGCGGTGATCGAGATGCGGGGCAATGCGGAAGATCGGCTGCTGGTTCGCG 6360  
CGTTCGGCGGACGCGAGGTCGCGCGGAGGCTGTGAGGGGCAATGAAGGTCGACCGGACGCGGCTCCATCTCGTGTTCGCGGCTTCGCGGCTTCGCGCTTCGCGCGCAACTGG 6480  
CGTCGAGAAAGCGCACCGCTATTCGCTTTCGCTCCGCGGAGCGCGCGGATGCGGAAACCGCGGATGATCGAGCTGCGGGGAGAAATGCGCGGCTTCGCGCTTCGCTTCGCT 6600  
GCGACATCAGGATCCGCGCGGCTGGAGCGCTTTCGCGGACGCTTCGTCGGAAGCAGCTTCGCTTCGCTTCGCTTCGCGGCGGATGGTGTTCGAGGATGCGCTGATCAGCAATCTG 6720  
CCGCGAAGCAACCGCGGCTTCGAAACGAAAGCGCAAGGGCGCGGCAATTCGATCGCTTACCCTGGTTCAGGCTCGCAACTTCATCTGTCTCTCGCGGACGAGCGT 6840  
CGGCAATCCGCGGAGCGGAACTATGTCGCGCAACCGGCTATCTCGAAGGCTTCGCGGTCGACGCGCGGAGGGCTTCGCGGAGGCTTCGCGCTTCGCGCGGATTCGCGAT 6960  
CGGCTACTGACGAAACCGGATGTCGCGGACGCTGCTCGCAACCGCATCGGCAAAACCGGCTGAAGGCGGAGGCGGCTTCGCGGAGGCTTCGCGCTTCGCGGAGGATTCGCG 7080  
CACGGTCGACCGCGGCTGTCGAGTTCGAGGATCGACTGACGCGTTCGCGGAACTTCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 7200  
GGCGCGAGGGCAGCAGATGATCTCGTCCGATGATCGAAGGCAATTCGCGCGAGGCGGAGGACCTCTTCGATGCTGGTGGCGCGGAGATCGCTGCCATCTTCGCTGCT 7320  
AAGGATACGGTCACTCGCGAAAGATGGAAGGAGATCGCGCTCGACCGCTCATGGCTGAACTCGGATGAGTTCACGAGAAACCGGCTTCGACATGCTTTCGAGCGGG 7440  
GCGGCAATACCAAGGTCGCGGACATCGCGCGCAAGCTTCATGAAAAGTAAAGCAACCGGTCACGAGGCAACGAGAACGAGGCGGTCGACGACAGCTT 7542  
A D N T T V G G D I A R K L H E K V S K P

#### 4.2.2. A *fix-23* régió 1. komplementációs egységében talált ORF-ek feltételezett fehérje termékei különböző zsírsav szintáz és poliketid szintáz enzimekkel homológok

Az ORF-ek lehetséges fehérje termékeit a FASTP komputer program segítségével összehasonlítottuk az NBRF és SWISSPROT fehérje adatbázisokban tárolt aminosav szekvenciákkal. Az ORF1-ről átírható fehérje szignifikáns homológiát mutat a patkány és csirke zsírsav szintáz enzimekhez, számos poliketid szintáz enzimhez, az *E. coli* FabB fehérjéhez és különböző *Rhizobium* fajok NodE fehérjéihez (15/a. ábra). Ezen fehérjék mindegyikét  $\beta$ -ketoacil szintáz (KS) enzimként ill. domainként

**15. ábra.** Aminosavkonzerváció a különböző zsírsav szintáz (FAS) és poliketid szintáz (PKS) enzimek vagy hasonló jellegű fehérjék és a feltételezett Fix-23 fehérjék között az aktív centrumok és NAD(P)H kötőhelyek környezetében. Aktív centrumok: **a.**  $\beta$ -ketoacil-szintáz, **b.** acil-transzferáz, **c.** dehidratáz, **d.** enoil reduktáz, **f.** keto reduktáz, **h.** ACP. NAD(P)H kötőhelyek: **e.** enoil reduktáz, **g.** ketoreduktáz. A konzerválódott aminosavakat (vastagított és aláhúzott betű) a Fix-23 szekvenciához viszonyítottuk. A csillagok aktív centrumot jelölnek (a dehidratáz esetén feltételezett aktív centrumot). A minden feltüntetett szekvenciában azonos aminosavakat bekereteztük (ebből a szempontból az **e.** és **g.** egy csoportnak számít). Rövidítések: FAS = zsírsav szintáz, eryA = eritromicin szintáz, MSAS = metilsziálsav szintáz, gra = granaticin szintáz, tcml = tetracenicin szintáz, NodE, NodF = gümőképzési fehérjék, FabA = tioészter dehidráz, FabB = 2-oxoacil szintáz, lp.lipáz = lipoprotein lipáz, DHFR = dihidrofolát reduktáz, alk. deh. = alkohol dehidrogenáz, ACP = acyl carrier protein. R.m.41 = *Rhizobium meliloti* 41, S.ery. = *Saccharopolyspora erythrae*, P.pat. = *Penicillium patulum*, S.viol. = *Streptomyces violaceoruber*, S.gla. = *Streptomyces glaucescens*, E.coli = *Escherichia coli*, S.cer. = *Saccharomyces cerevisiae*, R.leg. = *Rhizobium leguminosarum*, R.mel. = *Rhizobium meliloti*. A szekvencia információk forrásai: patkány zsírsav szintáz: Amy és mtsai 1989, eryA: Cortes és mtsai 1990, MSAS: Beck és mtsai 1990, gra: Sherman és mtsai 1989, tcml: Bibb és mtsai 1989, NodE és NodF R.mel.: Horváth és mtsai 1986, NodF R.leg.: Shearman és mtsai 1986, FabA: Cronan és mtsai 1988, FabB: Kauppinen és mtsai 1988, FAS S.cer.: Mohamed és mtsai 1988, ACP E.coli: Vanaman és mtsai 1986, ACP árpa: Hoj és mtsai 1983, lp.lipáz: Kirchgessner és mtsai 1987, DHFR: Stone és mtsai 1979, alk.deh.: Poulouise és Kolattukudy 1983.

RIShVfGLS	G	PSmTVDTA	C	SSSLVALDqAmrALna	G	EiDtALV	G	GVN	Fix23-1,R.m.41
RLSffFdfk	G	PSialDTA	C	SSSLIALqnAyqAirs	G	EcpaAiv	G	GiN	FAS,patkány
RvayVlGLE	G	PavTVDTA	C	SSSLVALhsAcgsLrd	G	dcglAva	G	GVs	eryA,S.ery.
RISyhlLnLm	G	PStaVDAa	C	aSSLVAihhgqvAirl	G	EskaAiv	G	GVN	MSAS,P.pat.
evawaaGae	G	PvtmVsdg	C	tSgLdsvglvAvqgtre	G	saDvvva	G	aad	gra,S.viol.
evaweaGae	G	PvtvVsTg	C	tSgLdAvgygtelird	G	raDvvvc	G	atd	tcmI,S.gla.
qvSmslGLr	G	PvfgVtsA	C	SSanhAiasAvdqikc	G	raDvmLa	G	Gsd	NodE,R.mel.
clatpFkih	G	vntsissA	C	atSahcignAveqiql	G	kqDivfa	G	Gge	FabB,E.coli
vnmliss	G	dikTpVgA	C	atSvesvDigvetils	G	kariciV	G	Gyd	FAS2,S.cer.

c/

KPtAvf	G	H	S	V	G	EIAAAYAGALS	L	vDAVs	IVA	Fix23-2,R.m.41
KPdgi	G	H	S	L	G	EvAcgYAdGcLSqre	AV	laay		FAS,patkány
PsAVi	G	H	S	q	G	EIAAAvvAGvLSLeDgVrvVA				eryA,S.ery.
tPqAVi	G	H	S	V	G	EIAAsvvAGALS	paegal	IV	t	MSAS,P.pat.
ylkgat	G	H	S	q	G	lvtAvaiAetdS	swesffvs	Vr		FAS,S.cer.
dnhll	G	y	S	L	G	ahAAgvAgsltnkknvritgl				lp.lipáz, egér

hv	D	ahlfPdLAE	H	VVD	G	kaIl	P	GSGfIeiAvsAa	Fix23-3,R.m.41
sp	D	...hyLvd	H	ciD	G	rVlf	P	GtGylvlvktl	FAS,patkány
st	D	..eqPwLAE	H	VVg	G	rtlv	P	GsvldlAlaAg	eryA,S.ery.
dn	D	..tkPfpgs	H	plh	G	teIv	P	aaGlIntflkgt	MSAS,P.pat.
np	D	...lwffgc	H	fi.	G	dpvm	P	Gclgl damwqlv	FabA,E.coli
dg	D	...llklv	H	lsn	G	ykmi	P	Gakplqvgdvvs	FAS,S.cer.
da	D	...ilrlv	H	lsn	G	fkmm	P	Gadplqmgddvs	FAS,Y.lipol.

d/

kGakViaIa	GSA	E	K	RrfL	tmlgad	Fix23-4,R.m.41
lGcrVftIv	GSA	E	K	RayL	qarfpp	FAS,patkány
fstgy	GSA	v	K	v		alk.deh.,ló

e/

ETiLIHg	G	S	G	GV	G	LAAIqvAklkGa	Fix23-4,R.m.41
ETvLIHs	G	S	G	GV	G	qAAisiAlslGc	FAS,patkány

f/

L	D	n	F	iL	FSS	attLV	G	NP	G	QSN	Y	Fix23-5,R.m.41
L	D	y	F	va	FSS	vscgr	G	Na	G	QSN	Y	FAS,patkány
L	D	a	F	vL	FSS	nagvw	G	sP	G	las	Y	eryA,S.ery.
v	D	f	F	vm	FSS	cgnLV	G	ft	G	Qas	Y	MSAS,P.pat.

g/

GvhLVvG	G	I	G	GF	G	LvAAnWLVKGA	Fix23-5,R.m.41
ksyitG	G	l	G	GF	G	LelArWLVlRGA	FAS,patkány
GtvLVtG	G	t	G	Gv	G	gqiArWLarrGA	eryA,S.ery
GtyLitG	G	l	G	vl	G	LevAdfLVKGA	MSAS,P.pat.
vavsqm	G	I	G	kn	G	dlpwpplRnefk	DHFR, egér

h/

kILkEi	G	LD	S	LMAVELgMsfQQ	Fix23-6,R.m.41
ssLadl	G	LD	S	LMgVEvrqiler	FAS,patkány
dl	G	fD	S	LaAVELrnr	eryA,S.ery
aaLadl	G	vD	S	vMtVtLrrqlQL	MSAS,P.pat.
itfeEl	G	yD	S	LalmEsasrier	gra,S.viol.
vtyqdl	G	yD	S	iallEisakleQ	tcmI,S.gla.
teLtal	G	vD	S	LgladiiwdeQ	NodF,R.mel.
Ltal	G	vD	S	Lgladvq	NodF,R.leg.
sfvedl	G	aD	S	LdtVELvMalee	ACP,E.coli
tIkdLv	G	gk	S	tvqnEilgdlgk	FAS,S.cer.
skfsEl	G	aD	S	LdtVEivMglee	ACP,árpa

írták le, vagy aminosav homológia alapján ebbe a csoportba sorolták. A legerősebb homológiát, 42 % aminosav azonosságot a patkány zsírsav szintáz megfelelő (KS) domainje mutatta a szekvencia teljes hosszában (16. ábra).

```

FIX1  MDPQQRVLLQLAWRALEDANISVASLHGENVGVYVGASSLDHANADGRRSAAAGPYFMTG  60
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FAS$RA MDPQLRLLLEVSYEAIVDGGINPASLRGTNTGVWVGVSGSEASEALSRDPETLLGYSMVG  60

      *
FIX1  NTLISIVSNRISHVFGLSGFSMTVDTACSSSLVALDQAMRALNAGEIDTAIVGGVNILAHP  120
      . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FAS$RA CQRAMMANRLSFFFDFKGPSIALDTACSSSLALQNAVQAIRSGECPAAIVGGINLLLKP  120

FIX1  LPFVGFAQARMLSPEGLCRAYDNDGAGYVRAEGGVVFLRRTDRAQREDRSYARIVASG  180
      . : : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FAS$RA NTSVQFMKLGMLSPDGTCSRFDGSGNGYCRAEAVVAVLLTKKSLAR----RVYATILNAG  176

FIX1  VNSAG-RTNGISLPSREAQANLLRMIYEGNGIDANQVAFVEGHGTGTVGDPAEVWSIGT  239
      . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FAS$RA TNTDGCKEQGVTFPSGEAQEQLIRSLYQFPGGVAPESLEYIEAHGTGTVGDPQELNGITR  236

FIX1  VIGA-KRAPVPIGSIKSNIGHTEPASGLFGMMKAVLALENNYLFPASLHFETPNEQIDFDG  298
      . : . . . . : : : : : : : : : : : : . . . . . : : : : : : : : : : : :
FAS$RA SLCAFRQSPLLIGSTKSNMGHPEPASGLAALTKVLLSLENGVWAPNLHFHNPENPEIP-AL  295

FIX1  LNVRVTANPIELLKGRARLAGINSFGFGGANAHVVISDFDPAQAEKAATSPAGPRVSGK  358
      : . : . . : : . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FAS$RA LDGRLQVVDREPL--PVRGGIVGINSFGFGGANVHVIL-QPNTQQAPAPAPHAALPHLLHA  352

FIX1  RPYRVEPRKPAQRL 372
      . : . . .
FAS$RA SGRTMEAVQGLLEQ 366

```

**16. ábra.** A Fix23-1 fehérje és a patkány zsírsav szintáz enzim acil transzferáz domain illesztése. A vízszintes vonal a szekvenciában hézagokat jelöl, melyet a komputer program a kedvező illesztés érdekében hoz létre. Csillaggal jelöltük az aktív centrumot. FIX1 = Fix-23-1 fehérje, FAS\$RA = patkány zsírsav szintáz acil transzferáz domain. Egy pont = hasonló karakterű aminosav, kettős pont = azonos aminosav.

A KS enzimek egyik legerősebben konzerválódott része a biokémiai kísérletekkel enzim aktivitás alapján kimutatott cisztein körüli aktív centrum. Az ORF1-ről átírható fehérjében is megtalálható ugyanabban a pozícióban ez a konzerválódott aminosav mintázat. Az összes KS enzimben meglévő, az aktív centrumot alkotó szakaszon kívül két jellegzetes, az *E. coli* FabB fehérjéhez ill. különböző *Rhizobium* fajok Node fehérjéihez erősen hasonló aminosav mintázat is konzerválódott az ORF1 fehérjében. Ezen fehérje szakaszok szerepe nem ismeretes.

Az ORF2 feltételezett terméke 26 % aminosav azonosságot mutat a patkány zsírsav szintáz enzim acil transzferáz domainjéhez. Más acil transzferázokkal valamivel gyengébb a homológia, de az ismert aktív centrum környezetében a legerősebben konzerválódott aminosavak, melyek mindegyik acil transzferázban közősek, a *fix-23* ORF2 fehérjében is megtalálhatók ugyanabban a pozícióban (15/b. ábra).

Az ORF3-ről átírható fehérje az adatbázisokban található aminosav szekvenciákhoz nem mutatott jelentős homológiát. Csak gyenge hasonlóságot találtunk a patkány zsírsav szintáz enzim valamint az eryA poliketid szintáz enzim feltételezett dehidratáz domainjeihez. Nemrég egy lehetséges konszenzust javasoltak a dehidratáz enzimek aktív centrumára (Bevitt és mtsai 1991). Ez a jellegzetes mintázat megtalálható az ORF3 fehérjében is ugyanabban a pozícióban, mint a patkány enzim megfelelő domainjében. Az ORF3 fehérje ezen szakasza különösen erős hasonlóságot mutat az EryA dehidratáz domainjének feltételezett aktív centrumával (15/c. ábra).

Az ORF4-ről átírható fehérje erősen homológ az állati zsírsav szintáz enzimek enoil reduktáz domainjeivel, valamint egy adott szakaszán számos alkohol dehidrogenáz enzimhez is hasonlóságot mutat. A zsírsav szintáz enoil reduktáz domaineik két különböző funkciójú konzervált szakasza ismeretes: egy glicin mintázat (GxGxxG) felelős a NAD(P)H kötésért, és egy lizin körüli aminosav mintázat az enzim aktív centruma. Mindkét jellegzetes szakasz erősen konzerválódva megtalálható az ORF4 termékében is a megfelelő pozícióban (15/d,e. ábra) Az ORF4 fehérje teljes

hosszában 44 % aminosav azonosságot mutat a patkány zsírsav szintáz enzim enoil reduktáz domainjével. A különböző alkohol dehidrogenáz enzimek és az ORF4 fehérje között elsősorban a NAD(P)H-t megkötő glicin mintázatot tartalmazó szakaszon figyelhetünk meg homológiát.

Az ORF5 feltételezhető fehérje terméke szekvencia hasonlóságot mutat az állati zsírsav szintáz enzimek valamint különböző poliketid szintáz enzimek ketoreduktáz domainjeivel. A legnagyobb homológiát, 37 % aminosav azonosságot a patkány zsírsav szintáz enzim megfelelő domainjével lehetett kimutatni. A ketoreduktázok - az enoil reduktázokhoz hasonlóan - NAD(P)H kötőhelyet tartalmaznak, az ennek megfelelő konszenzus az ORF5 fehérjében is megtalálható (15/g. ábra). Ugyancsak tartalmaz az ORF5 fehérje a megfelelő pozícióban egy olyan aminosav mintázatot, ami számos ketoreduktáz enzimben ill. domainben erősen konzerválódott, és amelyet lehetséges aktív centrumként tartanak számon, azonban ezt megerősítő kísérletes biokémiai bizonyítékok még nem állnak rendelkezésre (15/f. ábra).

A szekvenált régió utolsó nyitott leolvasási kerete az ORF6, melynek feltételezett fehérje terméke különböző zsírsav szintáz és poliketid szintáz rendszerek ACP enzimeivel ill. domainjeivel homológ. A *R. meliloti* konstitutív ACP-hez 32 % a teljes hosszában meglévő aminosav azonosság, a patkány zsírsav szintáz ACP domainjéhez 26 % (17. ábra). A legerősebb homológiát minden esetben az aktív centrum szerin aminosava környezetében találtuk (15/h. ábra). Az ORF6 fehérje C-terminálisa közelében található egy rövid aminosav motívum (TVGD), ami azonos pozícióban a *R. meliloti* konstitutív ACP-ben is megvan, teljes egészében hiányzik azonban az állati zsírsav szintáz ACP domainjéből (17. ábra).

**a**

```

FIX6          MIEGKSPQEAEDILFDLVAGEIAAILRVSK 30
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
FAS$RA GGTLPQRISSCMEVLDLFLNQPHAVLSSFVLAEKKAVAHGDGEAQRDLVKAVAHILGIRD 2060
      *
FIX6  -DTVTRGKILKEIGLDSLMAVELGMSFQONTGFDMPPLSGVADNTTVGDIARKLHEKVSKP 89
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
FAS$RA LAGINLDSSLADLGLDSLGMVEVRQILEREHDLVLP IREVRQLT-----LRKLQEMSSKA 2115

```

**b**

```

FIX6  MIEGKSPQEAEDILFDLVAGEIAAILRVSKDTVTRG-KILKEIGLDSLMAVELGMSFQQN 59
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
ACP$RH          SDIAERVKKIVIDHLGVDAEKVSEGASFIDDLGADSLDTVELVMAFEEE 49

FIX6  TGFDMPLSGVADNTTVGDIARKLHEKVSKP 89
      : . . . . . : . . . . . : . . . . .
ACP$RH FGVEIPDDAADSILTVGDAVKFIEKAQA 77

```

**c**

```

FIX6  MIEGKSPQEAEDILFDLVAGEIAAILRVSKDTVTRGKILKEIGLDSLMAVELGMSFQONT 60
      : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
NODF  MVDQLESEIIGI IKNRVESEGGDGETALIVGDLTAATELTALGVDSLGLADI IWDVEQAY 60

FIX6  GFDMPPLSGVADNTTVGDIARKLHEKVSKP 89
      : . . . . . : . . . . . : . . . . .
NODF  GIRIEMNTAEAWSDLQNVGDIVGAIRGLLTGA 93

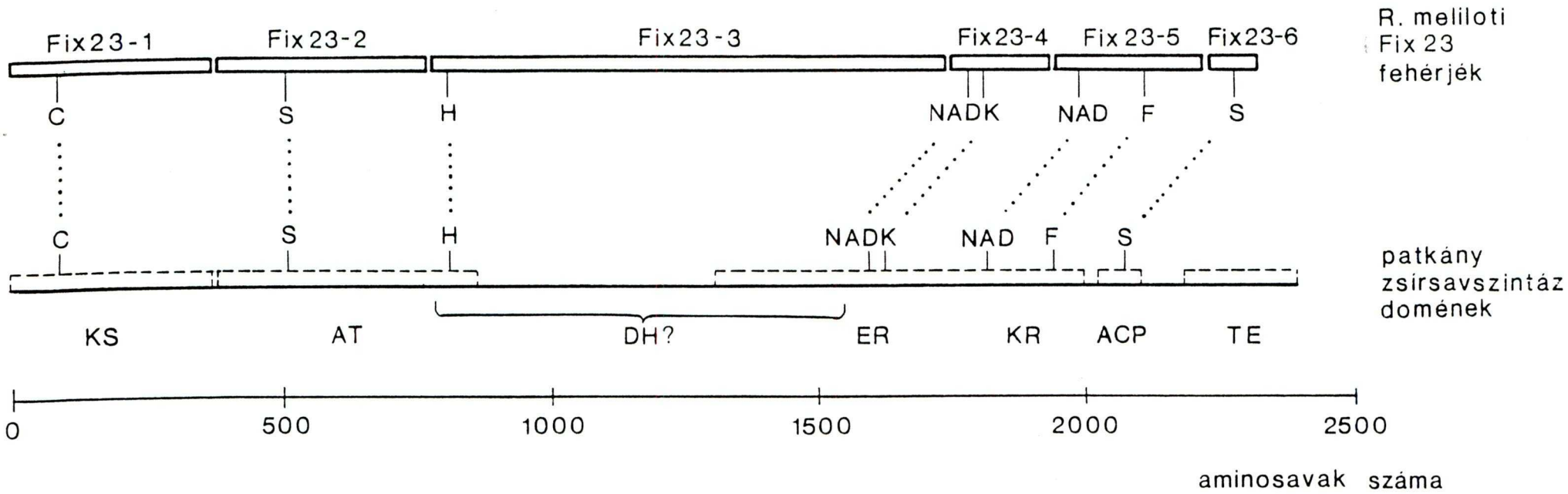
```

17. ábra. A Fix23-6 fehérje illesztése **a.** a patkány zsírsav szintáz enzim ACP domainjéhez, **b.** a *R.meliloti* konstitutív ACP-hez, **c.** a *R.meliloti* NodF fehérjéhez (a jelöléseket lsd. 16. ábra). FIX6 = Fix23-6 fehérje, ACP\$RH = *R. meliloti* konstitutív ACP.



A *fix-23* régió 1. komplementációs csoportjába tartozó gének (ORF-ek) sorrendje meglepő azonosságot mutat a patkány zsírsav szintáz enzim domainjeinek sorrendjével (18. ábra). A feltételezett fehérje termékek és a megfelelő patkány domainek mérete is hasonló. Az általános aminosav azonosság ugyan nem minden esetben nagyon magas, de az összes aktív centrum környezetében erősen konzerválódtak a legfontosabb aminosavak a *fix-23* feltételezett fehérje termékeiben is (18. ábra). A teljes hosszában igen erősen homológ patkány és csirke zsírsav szintáz enzim között a dehidratáz domain nem mutat különösebb hasonlóságot (Chang és Hammes 1990). A hat feltételezett *Fix-23* fehérje közül is az ORF3 terméke mutat csak gyenge hasonlóságot a megfelelő zsírsav szintáz domainhez, a dehidratázhoz.

**18. ábra.** A patkány zsírsav szintáz enzim funkcionális térképének összehasonlítása a *R.melloti fix-23* régió 1.komplementációs egysége által kódolt feltételezett fehérjékkel. Feltüntettük a létfontosságú cisztein (C), szerin (S), lizin (K) és a feltételezett aktív centrum hisztidin és fenilalanin (F) aminosavak pozícióját, valamint a NAD(P)H kötőhelyeket (NAD). KS =  $\beta$ -ketoacil szintáz, AT = acil transzferáz, DH = dehidratáz, ER = enoil reduktáz, KR = ketoreduktáz, ACP = acil carrier protein, TE = tioészteráz. A patkány zsírsav szintáz enzimben a szaggatott vonallal jelzett részek a közeli rokon csirke zsírsav szintáz enzimmal erősen homológ szakaszokat reprezentálják (Chang és Hammes 1990, Robinson 1991, Witkowsky és mtsai 1991).



#### 4.2.3. A *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű génjei nem komplementálják a megfelelő *E. coli* mutánsokat

Mivel a *R. meliloti fix-23* mutáns fenotípusa - azaz a fág rezisztencia és a gümőfejlődési defektus - az ép esszenciális zsírsav szintáz rendszerű baktériumokban megjelenik, nyilvánvaló, hogy a baktérium alapháztartási zsírsav szintézis enzimeit nem képesek helyettesíteni a *fix-23* gümőfejlődéshez ill. fágtapadáshoz szükséges funkcióit. Annak érdekében, hogy megtudjuk, vajon igaz-e ennek a fordítottja is, azaz képes-e a *fix-23* régió komplementálni az esszenciális zsírsav szintáz gének hibáját, a következő kísérleteket végeztük el. Mivel nem áll rendelkezésre olyan *R. meliloti* mutáns, ami az esszenciális zsírsav szintézisben lenne hibás, *E. coli* hőmérséklet szenzitív zsírsav szintézis mutánsokba juttattuk az erős *E. coli* promotor mögé épített megfelelő *fix-23* DNS szakaszokat. Amikor a hőmérsékletet 30 °C-ról a nonpermisszív 42 °C-ra emeltük, nem észleltünk komplementációt az *E. coli*  $\beta$ -ketoacil szintáz (*fabBF*) vagy acil transzferáz (*fabD*) mutánsok esetében. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a *fix-23* régió génjei függetlenek az esszenciális zsírsav szintézis rendszertől, és speciális funkciót látnak el.

#### 4.2.4. A *fix-23* régió 1. komplementációs egységét alkotó gének expressziója

Putnok Péter és munkatársai a *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű génjeiben Tn10LK transzpozonos mutagenézis segítségével transzlációs *lacZ* fúziókat állítottak elő. A fúziókat tartalmazó kozmid klónok *E. coli*-ban alacsony, háttérnek megfelelő aktivitást mutáltak (10 Miller unit alatt). Ugyanezen fúziók aktivitása *R. meliloti* 41-ben 100-160 Miller unit erősségűnek bizonyult (összehasonlításképp a *nodD1* gén hasonló fúzióval mért expresszió szintje kb. 300 Miller unit).



A *R. meliloti* 41-ben meglévő, de *R. meliloti* 1021-ből hiányzó *lpsZ* génről feltételezik, hogy az *lps* gének egyik regulátora (Williams és mtsai 1990). Megvizsgáltuk, vajon kontrollálja-e a *fix-23* gének expresszióját is az *lpsZ* gén. Különböző aktív, a *fix-23* régió 1. komplementációs egységébe térképeződő Tn10LK fúziókat konjugáltunk *R. meliloti* 1021-be. A zsírsav szintáz jellegű *fix* gének expressziójában nem találtunk szignifikáns különbséget a *R. meliloti* 1021 és 41 között, vagyis az *lpsZ* gén nem volt detektálható hatással a vizsgált *fix-23* gének kifejeződésére.

A *nifA* és *nifH* géneket kontrollként használva mikroaerob körülmények között vizsgáltuk a *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű génjeinek kifejeződését. A *lacZ* fúziót tartalmazó *nif* gének az irodalomból jól ismert aktiválódást mutatták, a vizsgált, Tn10LK fúziós *fix-23* gének expressziója azonban nem változott. Az eltérő növekedési hőmérséklet (16 °C - 32 °C) alkalmazása sem eredményezett szignifikáns különbségeket a *fix-23* zsírsav szintáz jellegű gének kifejeződésében .

## 5. MEGVITATÁS

A dolgozat a *R. meliloti* 41 egy szimbiózisban és fágkötésben egyaránt szerepet játszó DNS régiójának analízisét mutatja be. Vizsgáltuk az itt elhelyezkedő gének által meghatározott sejtfelszíni struktúra kémiai természetét, valamint meghatároztuk a régió legnagyobb géncsoportjának nukleotidsorrendjét, melynek segítségével valószínű funkciójáról is lényeges információkat szereztünk.

A *fix-23* régió által meghatározott struktúra azonosítása érdekében fágtapadási tesztek végeztünk. Hasonló módszert alkalmaztak különböző *E. coli*, *Salmonella* és *Pseudomonas* fágok receptorának izolálása és jellemzése során (Takeda és Uetake 1973, Jarrell és Kropinsky 1976, Hancock és Reeves 1976, Jarrell és Kropinsky 1977). A proteináz-K kezelt sejtburokkal ill. izolált LPS-sel végzett tapadási tesztek eredményeire támaszkodva megállapítottuk, hogy a *fix-23* gének egy poliszacharid típusú fágreceptor kialakítását végzik. A struktúra poliszacharid jellege annak alapján is valószínűsíthető, hogy a gümőfejlődés során képes helyettesíteni az EPS szerepét (Putnoky és mtsai 1990).

A fág kötődésének  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció függése erősen emlékeztet az LPS receptorú fágok esetében ismeretes kinetikára (Takeda és Uetake 1973). A *R. leguminosarum* LPS szintézisben hibás mutánsainak vizsgálata során leírták, hogy megfelelő körülmények között tenyésztve a mutáns sejtek összetapadnak (autoagglutináció) (Priefer 1989). Az elsősorban a sejtfelszíni töltésváltozás következtében fellépő autoagglutinációt a vizsgált *fix-23* mutánsok esetében is tapasztaltuk.

További kémiai vizsgálataink során a fágtapadási tesztben aktívnak bizonyult LPS kivonatokat használtunk. Hasonló kromatográfiás elválasztást végeztek Williams és mtsai (1990) az általuk leírt *lpsZ* génben mutáns AK631 baktériumból izolált LPS kivonattal. A kromatográfiás eredmények azt mutatják, hogy - az *lpsZ* mutánsokhoz hasonlóan - a *fix-23* mutánsokban az LPS csúcs lefutása megváltozik, vagyis a régió által meghatározott struktúrát az LPS frakció tartalmazza.

A *fix-23* régió legnagyobb komplementációs egységének szekvenenciaanalízise alapján 6 kódoló ORF léte valószínűsíthető. Ezen ORF-ek elhelyezkedésük, átíródási irányuk és promoter jellegű elemeik pozíciója alapján elképzelhető, hogy egy operont alkotnak.

Az ORF-ekről átírható fehérjetermékek mindegyike egy-egy zsírsav vagy poliketid szintézisben résztvevő enzim vagy domain legerősebben konzerválódott (általában az aktív centrumot reprezentáló) szakaszához mutat homológiát. A zsírsav és poliketid szintézisben résztvevő enzimeket aminosav homológia figyelembevételével egy csoportba soroló közlemények alapján (Hopwood és Sherman 1990, Amy és mtsai 1989, Cortes és mtsai 1990, Beck és mtsai 1990) a feltételezett *fix-23* fehérjetermékeket is ebbe a családba tartozónak tekinthetjük.

A *R. meliloti fix-23* régiójának 1. komplementációs egységét alkotó zsírsav szintáz jellegű gének feltételezett fehérje termékei és a patkány zsírsav szintáz enzim funkcionális domainjei között meglepő hasonlóságot fedeztünk fel. A domainek ismert vagy feltételezett aktív centrumai erősen konzerválódva kivétel nélkül megtalálhatók a *fix-23* fehérjékben, pontosan a megfelelő pozíciókban. Érdekes módon még a *fix* fehérjéket kódoló gének sorrendje is egyezik a patkány enzim domainek sorrendjével.

A zsírsav szintáz aktív centrumaiban egy vagy több glicin pozíciója szigorúan konzerválódott. A jelenség oka egyelőre nem ismeretes. Elképzelhető, hogy kulcsszerepet játszanak az aktív centrum térszerkezetének kialakításában azáltal, hogy - mivel a glicin a legkisebb aminosav - biztosítják a katalitikus reakció helyigényét.

Feltételezik, hogy a magasabbrandű élőlények sok domaines zsírsav szintáz enzimét kódoló óriási génje különálló bakteriális gének fúziója útján alakulhatott ki az evolúció folyamán (McCarthy és Hardie 1984, Hardie és McCarthy 1986). Több munkacsoport közölt teljes patkány, csirke és élesztő zsírsav szintáz cDNS szekvenciát (Schweizer és mtsai 1986, Chirala és mtsai 1987, Mohamed és mtsai 1988, Amy és mtsai 1989, Holzer és mtsai 1989, Schweizer és mtsai 1989), de

prokariotából nagyon kevés hasonló adat áll rendelkezésre. Az egyetlen ismert szekvenciájú esszenciális baktérium zsírsav szintáz gén, melynek funkciója megegyezik az emlős enzim valamelyik domainjével, és számottevő homológiát is mutat vele, az *E. coli fabB* génje (Kauppinen és mtsai 1988). Érdekes módon a *fix-23* ORF1 fehérje terméke nagyobb aminosav azonosságot mutat a patkány enzim megfelelő domainjével, mint az *E. coli FabB* fehérjével (42 % ill. 29 %). Ismert ugyan még néhány nem esszenciális zsírsav szintáz jellegű gén (poliketid szintázok, nodulációs gének) szekvenciája prokariotákból, de a patkány zsírsav szintáz enzim domainjeinek a *R. meliloti* 41-ben talált, különálló génekből összetevődő megfelelője az eddigi legerősebb alátámasztása annak az elméletnek, mely szerint a zsírsav szintáz gének evolúciója génfúziós úton zajlott. A *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű géncsoportjának feltételezett fehérje termékei csak egészen gyenge homológiát mutatnak az élesztő enzim megfelelő domainjeihez, megerősítve ezzel azt a feltételezést, hogy az evolúció folyamán az emlős és élesztő gének fejlődése korán szétvált egymástól (Chang és Hammes 1990).

A *R. meliloti* zsírsav szintáz jellegű géncsoportjának feltételezett fehérje termékei rendkívül hasonlóak a patkány enzimet alkotó funkcionális domainelekhez, ami hasonló funkciót sejtet. A hat új *fix* génbe juttatott Tn5 inszerciók azonban nem eredményezik a sejt pusztulását, ami arra enged következtetni, hogy ezek a gének nem az esszenciális zsírsavak szintéziséért felelősek. Valószínűleg - hasonlóan a szintén zsírsav szintáz jellegű poliketid szintáz enzimekhez (Beck és mtsai 1990, Bibb és mtsai 1989, Cortes és mtsai 1990, Donadio és mtsai 1991, Sherman és mtsai 1989) - a sejt valamilyen specifikus struktúráinak felépítésében vesznek részt. A létfontosságú zsírsav szintáz enzimekhez hasonló fehérjék segítségével attól merőben eltérő funkciójú végterméket állítanak elő.

A *fix-23* régió 1. komplementációs egysége *R. meliloti* 41-ben az egy sejten belül párhuzamosan működő harmadik zsírsav szintáz jellegű rendszert határozza meg. A létfontosságú zsírsav szintáz gének mellett (melyeket *R. meliloti*-ban még nem azonosítottak) a második ilyen jellegű géncsoportot a *nodEFG*L gének alkotják,

melyek valószínűleg egy gazdanövény specifikus lipo-oligoszacharid szignálmolekula (NodRm-1) lipid részének felépítésében vesznek részt (Lerouge és mtsai 1990). A *nodF* gén termékéről bizonyították, hogy ACP (Geiger és mtsai 1991), a NodE fehérje ketoacil szintázokkal homológ (Bibb és mtsai 1989), a NodL valószínűleg acil transzferáz (Surin és mtsai 1988, Downie 1989), a NodG pedig ketoreduktázokhoz hasonló (Hallam és mtsai 1988). A *R. meliloti* 41 legalább három különböző funkciójú ACP-t tartalmaz: az esszenciális ACP-t (Platt és mtsai 1990), a NodF fehérjét (Geiger és mtsai 1991) és a *fix-23* ORF6 feltételezett termékét. Ezzel szemben *E. coli*-ban egyféle ACP ismeretes (Geiger és mtsai 1991).

Genetikai, biokémiai és fiziológiai kísérleteink eredménye alapján valószínűsíthető, hogy a *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű géncsoportja egy specifikus sejtfelszíni struktúra lipid részének a felépítésében vesz részt. Ez a feltételezett struktúra alapvető szerepet játszik a szimbiotikus gümő kialakulása során. Funkciója az EPS-hez hasonló, azzal helyettesíthető a *R. meliloti* 41 gazdanövényein. Valószínűleg - ahogyan az EPS esetében is feltételezik (Gray és Rolfe 1990) - a gümőfejlődés során zajló baktérium-növény kommunikációban vesz részt.

Korai stádiumban lévő kísérleteink szerint a *fix-23* - *exoB* kettős mutáns baktériumok Fix<sup>-</sup> fenotípusa részlegesen helyreállítható növényi testben, ha a mutáns baktériumokkal együtt a vad típusúból izolált EPS-t is bejuttatjuk a rendszerbe. A jelenség pontos leírásához további vizsgálatokra van szükség, melyekben a *fix-23* régió által meghatározott struktúrát is felhasználjuk.

*Rhizobium*okban a lipidet, poliszacharidot és KDO-t egyaránt tartalmazó egyetlen eddig leírt sejtfelszíni struktúra a lipopoliszacharid (LPS). *E. coli*-ban azonban a közel 100 féle K-antigén közül jó néhánynak az LPS-re emlékeztet a felépítése (Boulnois és Jann 1989, Jann és Jann 1990). Poliszacharid részük vagy lipid-A-hoz kapcsolódik (ez valódi LPS), vagy foszfolipidhez, és KDO-t is tartalmaznak. Az ilyen típusú K-antigének (pl. a K1, K5, K7, K92) szintéziséért felelős gének hasonló csoportosulást mutatnak a *fix-23* régióban található génekéhez (Roberts és mtsai 1988, Boulnois és Roberts 1990). Ezen belül egy 8-9 kb nagyságú, számos génből álló egység, ami



elsősorban a K-antigének transzferfolyamatait határozza meg, hasonló méretű a *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű géncsoportjához. Ezeknek az *E. coli* géneknek nem ismeretes a DNS szekvenciája, de a detektált fehérje termékek száma, mérete, valamint a transzkripció iránya nem egyezik a *fix-23* régió 1. komplementációs egységében találtakal (Boulnois és Jann 1989). *Rhizobium*okban eddig még nem írtak le ilyen típusú K-antigéneket, de figyelembe kell vennünk azt a lehetőséget, hogy ilyen jellegű sejtfelszíni poliszacharid struktúra *R. meliloti*ban is létezhet.

Kooperációs partnereink, R.W. Carlson (Complex Carbohydrate Research Center, Georgia, USA) és D.Noel (Marquette University, Milwaukee, USA) eredményei azt jelzik, hogy a *fix-23* mutánsokban eltűnik egy nagy molekulásúlyú antigén, ami nem tartozik a hagyományos LPS kategóriába, de hasonló kémiai karaktere miatt együtt tisztítódik az LPS-sel. A molekula poliszacharid részének analízise jelentős mennyiségű KDO és különböző uronsavak mellett glükóz, xilóz és mannoz jelenlétét mutatta. Az LPS tisztítási módszerrel izolált majd a hagyományos LPS-től elválasztott mintában ugyan nem lehetett zsírsavakat kimutatni, ezek azonban elveszhetnek az izolálás során, ha olyan labilisan kötődnek a poliszacharid részhez, mint az *E.coli* K-antigének esetén. Más, az *E.coli* K-antigének analízisekor kidolgozott tisztítási technikák alkalmazásával valószínűleg eldönthető a zsírsav tartalom kérdése. Az eddigi kémiai és genetikai eredmények együttesen arra engednek következtetni, hogy a *fix-23* gének által meghatározott struktúra egy olyan új típusú, KDO gazdag *Rhizobium* poliszacharid, ami az *E.coli* K-antigének egy csoportjához hasonló tulajdonságokkal rendelkezik.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat egy szimbiotikus gümőfejlődésben résztvevő géncsoport szerkezetének és funkciójának analízisét tárgyalja. Vizsgálataink során a következő jelentősebb következtetésekre jutottunk:

- Megállapítottuk, hogy a *fix-23* gének olyan sejtfelszíni struktúra felépítésében vesznek részt, ami poliszacharid természetű fágreceptorként szolgál.
- Izoláltuk és tisztítottuk a struktúrát. Kromatográfiás vizsgálataink szerint a *fix-23* gének által meghatározott molekula az LPS frakcióban található, KDO és lipid tartalmú poliszacharid.
- M13 és pBS vektorokba épített átfedő DNS szakaszok szekvencia analízise segítségével meghatároztuk a *fix-23* régió 1. komplementációs egységének nukleotid sorrendjét.
- Komputeralizálással hat egyirányban átíródó nyitott leolvasási keret valószínűsíthető, melyek feltehetően egy transzkripciós egységet alkotnak.
- Kimutattuk, hogy a nyitott leolvasási keretokről átírható feltételezett fehérje-termékek különböző zsírsav szintáz és poliketid szintáz enzimekkel mutatnak homológiát. Különösen a patkány zsírsav szintáz enzim funkcionális domainjeivel talált nagyfokú hasonlóság meglepő. Az aktív centrumoknak megfelelő pozíciókban erős a konzerválódás, sőt, a Fix fehérjét kódoló gének sorrendje is egyezik a patkány enzim domainek sorrendjével.
- Megállapítottuk, hogy a *fix-23* régió vizsgált zsírsav szintáz jellegű génei nem komplementálják a megfelelő *E. coli* mutánsokat.
- Riporter gén fúziókkal végzett expressziós kísérleteink szerint a *fix-23* gének a szabadon élő baktériumokban egyenletes, mérsékelt erősséggel fejeződnek ki, melyet a vizsgált tartományban nem befolyásol a hőmérséklet és a mikroaerob körülmények, valamint az *IpsZ* gén jelenléte sem.
- Eredményeink azt mutatják, hogy a *R. meliloti* 41-ben megtalálhatóak a patkány zsírsav szintáz enzim domainjainek különálló fehérjékből álló

megfelelői. Ez az eddigi legerősebb alátámasztása annak az elméletnek, mely szerint a zsírsav szintáz gének evolúciója génfúziós úton zajlott.

- A szekvencia analízis alapján feltételezett hat új zsírsav szintáz génbe épülő Tn5 inszerció nem okozza a baktérium pusztulását, vagyis ezek a gének nem a *R. meliloti* esszenciális zsírsav szintéziséért felelősek. Genetikai, biokémiai, és fiziológiai kísérleteink alapján valószínűsíthető, hogy a *fix-23* régió zsírsav szintáz jellegű géncsoportja egy szimbiózis specifikus sejtfelszíni struktúra zsírsav részének a felépítésében vesz részt.

## 7. KÖZLEMÉNYEK

### 7.1. Referált közlemények

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

Baev N, Endre G, **Petrovics G**, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1991) Six nodulation genes of *nod*-box locus n4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. Mol. Gen. Genet. 228:113-124

**Petrovics G**, Putnoky P, Reuhs B, Thorp TA, Noel KD, Carlson RW, Kondorosi Á (1992) A novel type of surface polysaccharide involved in symbiotic nodule development requires the expression of a new fatty acid synthase-like gene cluster in *Rhizobium meliloti* (közlésre beküldve)

### 7.2. Nemzetközi konferencia kiadványok

**Petrovics G**, Putnoky P, Ha DTC, Grosskopf E, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1987) Genetic and a preliminary functional analysis of a *Rhizobium meliloti* DNA region involved in nodule development. Proceedings of the VI. Symposium on Genetics of Nitrogen Fixation, Szeged, Hungary

**Petrovics G**, Putnoky P, Ha DTC, Grosskopf E, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1988) Analysis of a *Rhizobium meliloti* chromosomal region involved in nodule development. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After, H Bothe, FJ de Bruijn and WE Newton (eds). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York pp 496

Putnoky P, **Petrovics G**, Grosskopf E, Ha DTC, Kondorosi Á (1988) Analysis of *Rhizobium meliloti* *fix* regions involved in nodule development. In: Molecular Plant-Microbe Interactions, DPS Verma, R Palacios (eds). APS Press pp 181-182



Grosskopf E, Putnoky P, **Petrovics G**, Ha DTC, Bánfalvi Z, Lados M, Slaska-Kiss K, Kondorosi Á (1988) *Rhizobium meliloti* fix genes involved in nodule development and *nif* gene expression. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After, H Bothe, FJ de Bruijn and WE Newton (eds). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York pp 490

**Petrovics G**, Putnoky P, Kondorosi Á (1990) The function of a nodule developmental DNA region in *Rhizobium meliloti*. Proceedings of the VII. Symposium on Genetics of Nitrogen Fixation, Poznan, Poland

Putnoky P, **Petrovics G**, Kereszt A, Grosskopf E, Kondorosi Á (1990) *Rhizobium meliloti* LPS and EPS can provide the same function in nodule development. Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Interlaken, Switzerland pp 113

## 8. IRODALOM

- Aman P, McNeil M, Franzén LE, Darvill AG, 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
- Amy CM, Witkowski A, Naggert J, Williams B, Randhawa Z, Smith S (1989) Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3114-3118
- Allen ON, Allen EK (1981) The *Leguminosae*. The University of Wisconsin Press, Madison
- Appleby CA (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:443-478
- Bánfalvi Z, Kondorosi É, Kondorosi Á (1985) *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. Plasmid 13:129-138
- Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1989) Production of root hair deformation factors by *Rhizobium meliloti* nodulation genes in *Escherichia coli* - HsnD (NodH) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. Plant Mol. Biol. 13:1-12
- Beck J, Ripka S, Siegner A, Schiltz E, Schweizer E (1990) The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Eur. J. Biochem. 192:487-498
- Bergmann H, Preddie E, Verma DPS (1983) Nodulin-35: A subunit of nodule-specific uricase (uricase II) induced and localized in uninfected cells. EMBO J. 2:2333-2339
- Bibb MJ, Biro S, Motamedi H, Collins JF, Hutchinson CR (1989) Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* *tcml* genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. EMBO J. 8:2727-2736
- Beringer JE (1975) R-factor transfer of *Rhizobium leguminosarum*. J.Gen.Microbiol. 84:188-198
- Bisseling T, Been C, Klugkist J, vanKammen A, Nadler K, (1983) Nodule-specific host proteins in effective and ineffective root nodules of *Pisum sativum*. EMBO J.2:961-966
- Boulnois GJ, Jann K (1989) Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. Mol. Microbiol. 3:1819-1823
- Boulnois GJ, Roberts IS (1990) Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 150:1-18

- Burn JE, Hamilton WD, Wootton JC, Johnston AWB (1989) Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene *nodD* of *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 3:1567-1577
- Callaham D, Torrey IG, (1981) The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can.J.Bot.* 59:1647-1664
- Carlson RW, Kalembasa S, Turowski D, Pachori P, Noel D, (1987) Characterization of the lipopolysaccharide from *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J.Bacteriol.* 169:4923-4928
- Cava JR, Elias PH, Turowski DA, Noel KD, (1989) *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J.Bacteriol.* 171:8-15
- Chang SI, Hammes GG (1990) Structure and mechanism of action of a multifunctional enzyme: Fatty acid synthase. *Acc. Chem. Res.* 23:363-369
- Chirala SS, Kuziora MA, Spector DM, Wakil SJ (1987) Complementation of mutations and nucleotide sequence of *FAS1* gene encoding  $\beta$  subunit of yeast fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* 262:4231-4240
- Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, Bevitt DJ, Leadlay PF (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* 348:176-178
- Cronan JE, Li WB, Coleman R, Narasimhan M, Mendoza D, Schwab JM (1988) Derived amino acid sequence and identification of active site residues of *Escherichia coli*  $\beta$ -hydroxydecanol thioester dehydrase. *J. Biol. Chem.* 263: 4641-4646
- Dagert H, Ehrlich SD, (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28
- de Maagd RA, van Rossum C, Lugtenberg BJJ (1988) Recognition of individual strains of fast-growing *Rhizobia* by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 170: 3782-3785
- de Maagd RA, Rao AS, Mulders IHM, Goose-de Roo L, van Loosdrecht MCM, Wijffelman CA, Lugtenberg BJJ (1989) Isolation and characterisation of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* 171: 1143-1150
- Darvill AG, Albersheim P (1984) Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.*35:243-275
- Devereux J, Haberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395

- Diaz CL, Melchers LS, Hooykaas PJJ, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* - legume symbiosis. *Nature* 338:579-581
- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351
- Ditta G, Virts E, Palomares A, Kim C-H (1987) The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* 169:3217-3223
- Doherty D, Leigh JA, Glazebrook J, Walker GC (1988) Mutants of *Rhizobium meliloti* that overproduce its acidic Calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170:4249-4256
- Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1991) Modular organisation of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252:675-679
- Downie JA (1989) The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*. *Mol. Microbiol.* 3:1649-1651
- Dubois M, Giles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356
- Dudley ME, Jacobs TW, Long SR (1987) Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* 171:289-301
- Dylan T, Telpi L, Stanfield S, Kashyap L, Douglas C, Yanofski M, Nester E, Helinski DR, 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
- Figurski DH, Helsinki DR, (1979) Replication of an origine-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652
- Finan TM, Hartweg E, LeMieux K, Bergman K, Walker GC, Signer ER (1984) General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 159: 120-124
- Finan TM, Kunkel B, de Vos GF, Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* 167:66-72
- Geiger O, Spaink HP, Kennedy EP (1991) Isolation of the *Rhizobium leguminosarum* NodF nodulation protein: NodF carries a 4'-phosphopantetheine prosthetic group. *J. Bacteriol.* 173:2872-2878
- Glazebrook J, Walker GC (1989) A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56:661-672



- Glazebrook J, Reed JW, Reuber TL, Walker GC (1990) Genetic analyses of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 12:67-70
- Gray JX, Rolfe BG (1990) Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol.* 4:1425-1431
- Györgypál Z, Iyer N, 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
- Hahn MG, Cheong JJ (1991) Molecular recognition in plants: Identification of a specific binding site for oligoglucoside elicitors of phytoalexin accumulation. In: *Advances in Mol. Genet. of Plant-Microbe Interactions* Hennecke H, Verma DPS eds. 1:403-420
- Hallam SE, Malpartida F, Hopwood DA (1988) Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 74:305-320
- Hancock REW, Reeves P (1976) Lipopolysaccharide-deficient, bacteriophage-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 127:98-108
- Hardie DG, McCarthy AD (1986) Evolution of fatty acid synthase systems by gene fusion. In: *Hardie DG, Coggins JR (eds) Multidomain proteins-structure and evolution.* Elsevier Science Publishers, BV, pp 229-258
- Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG, Bisseling T (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1244-1248
- Høj PB, Svendsen B (1983) Barley acyl carrier protein - its amino acid sequence and assay using purified malonylCoA-ACP transacylase. *Carlsberg Res. Commun.* 48:285-305
- Holzer KP, Liu W, Hammes GG (1989) Molecular cloning and sequencing of chicken liver fatty acid synthase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4387-4391
- Hopwood DA, Sherman DH (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24:37-66
- Horváth B, Kondorosi É, John M, Schmidt J, Török I, Györgypál Z, Barabás I, Wieneke U, Schell J, Kondorosi Á (1986) Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity on alfalfa. *Cell* 46:335-343
- Horváth B, Bachem CWB, 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
- Ish-Horovitz D, Burke JF, (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998

- Jann B, Jann K (1990) Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150:19-42
- Jarrell K, Kropinsky AMB (1976) The isolation and characterization of a lipopolisaccharide-specific *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage. *J. Gen. Virol.* 33:99-106
- Jarrell K, Kropinsky AM (1977) Identification of the cell wall receptor for bacteriophage E79 in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *J. Virol.* 23:461-466
- John M, Schmidt J, Wieneke U, Krüssmann H-D, Schell J (1988) Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein NodC. *EMBO J.* 7:583-588
- Kauppinen S, Siggaard-Andersen M, Wettstein-Knowles P (1988)  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase I of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence of the *fabB* gene and identification of the cerulenin binding residue. *Carlsberg Res. Commun.* 53:357-370
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jakson JJ, Carlo DJ (1978) A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram negativ bacteria. *Anal.Biochem.* 85:595-601
- Keen NT (1988) Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:421-440
- Kirchgessner TG, Svenson KL, Lusic AJ, Schotz MC (1987) The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 262:8463-8466
- Kondorosi É, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193:445-452
- Kondorosi É, Kondorosi Á (1986) Nodule induction on plant roots by *Rhizobium*. *Trends Biochem. Sci.* 11:296-299
- Leigh JA, Signer ER, Walker GC (1985) Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6231-6235
- Leigh JA, Reed JW, Hanks JF, Hirsch AM, Walker GC (1987) *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinilate their calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* 51:579-587
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784
- Lindberg AA, (1967) Studies of a receptor for Felix 0-1 phages in *Salmonella minnesota*. *J.Gen.Microbiol.* 48:225-233

- Long S, Reed JW, Himawan J, Walker GC (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 EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- McCarthy AD, Hardie DG (1984) Fatty acid synthase-an example of protein evolution by gene fusion. Trends Biochem. Sci. 9:60-63
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol. 149:114-122
- Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Miller K, Kennedy EP, Reinhold VN (1986) Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. Science 231:48-51
- Mills KK, Bauer WD (1985) *Rhizobium* attachment to clover roots. J. Cell Sci. Suppl. 2:333-345
- Mohamed AH, Chirala SS, Mody NH, Huang WY, Wakil SJ (1988) Primary structure of the multifunctional a subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from FAS2 gene sequence. J. Biol. Chem. 263:12315-12325
- Müller P, Hynes M, Kapp D, Niehaus K, Pühler A (1988) Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. Mol. Gen. Genet. 211:17-26
- Noel KD, Vandenbosch KA, Kulpaca B (1986) Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 168:1392-1401
- Norrande J, Kempe T, Messing J (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26:101-106
- Orme-Johnson WH (1985) Molecular basis of biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Biophys. Chem. 14:419-459
- Orosz L, Sváb Z, Kondorosi Á, Sík T (1973) Genetic studies on rhizobio-phage 16-3. Genes and functions on the chromosome. Mol. Gen. Genet. 125:341-350
- Platt MW, Miller KJ, Lane WS, Kennedy EP (1991) Isolation and characterisation of the constitutive acyl carrier protein from *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 172:5440-5444

- Poulose AJ, Kolattukudy PE (1983) Sequence of a tryptic peptide from the NADPH binding site of the enoyl reductase domain of fatty acid synthetase. Arch. Biochem. Biophys. 220:652-656
- Powell R, Gannon F (1988) The leghaemoglobins. BioEssays 9:117-121
- Priefer UB (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, Cam Ha DT, Kiss GB, Kondorosi Á (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, Cam Ha DT, Bánfalvi Z, Kondorosi Á (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide (LPS) and exopolysaccharide (EPS) can provide the same function in plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 172:5450-5458
- Reuber TL, Reed JW, Glazebrook J, Urzainqui A, Walker GC (1991) Analyses of the roles of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides in nodulation. In: Hennecke H, Verma DPS (eds) Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe interactions, vol.1. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp182-188
- Rietschel ET, (ed) (1985) Handbook of endotoxines vol.1. Elsevier Science publishers, Amsterdam
- Roberts IS, Mountford R, Hodge R, Jann KB, Boulnois GJ (1988) Common organisation of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170:1305-1310
- Robinson JA (1991) Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. Phil. Trans. R. Soc. Lond B. 332:107-114
- Rostás K, Kondorosi É, Horváth B, Simoncsits A, Kondorosi Á (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1757-1761
- Russa R, Lorkiewicz Z. (1974) Fatty acids present in the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 119:771-775
- Russel M, Kidd S, Kelley MR (1986) An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. Gene 45:333-338
- Ryan CA (1987) Oligosaccharide signaling in plants. Annu. Rev. Cell Biol. 3:295-317
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467
- 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 (1990) The ENOD12

- gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60:281-294
- Schmidt J, Wingender-Drissen R, John M, Wieneke U, Schell J (1988) *Rhizobium meliloti nodA* and *nodB* genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8578-8582
- Schubert KR (1986) Products of biological nitrogen fixation: synthesis, transport, and metabolism. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 37:539-574
- Schultze M, Quiclet-Sire B, Kondorosi É, Virelizier H, Glushka JN, Endre G, Gero SD, Kondorosi Á (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipopoligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:192-196
- Schweizer M, Roberts LM, Höltke HJ, Takabayashi K, Höllerer E, Hoffmann B, Müller G, Köttig H, Schweizer E (1986) The pentafunctional *FAS1* gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. *Mol. Gen. Genet.* 203:479-486
- Schweizer M, Takabayashi K, Laux T, Beck KF, Schreglmann R (1989) Rat mammary gland fatty acid synthase: localization of the constituent domains and two functional polyadenylation/termination signals in the cDNA. *Nucleic Acids Res.* 17:567-586
- Shearman CA, Rossen L, Johnston AWB, Downie JA (1986) The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and its regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. *EMBO J.* 5:647-652
- Sherman DH, Malpartida F, Bibb MJ, Kieser HM, Bibb MJ, Hopwood DA (1989) Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. *EMBO J.* 8:2717-2725
- Stone D, Paterson SJ, Raper JH, Phillips AW (1979) The amino acid sequence of dihydrofolate reductase from the mouse lymphoma L1210. *J. Biol. Chem.* 254:480-488
- Sutherland IW (1985) Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:243-270
- Surin BP, Downie JA (1988) Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes *nodLMN* involved in efficient host-specific nodulation. *Mol. Microbiol.* 2:173-183
- Szeto WW, Nixon TB, Ronson CW, Ausubel FM (1987) Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* 169:1423-1432

- Takeda K, Uetake H (1973) *In vitro* interaction between phage and receptor lipopolysaccharide: a novel glycosidase associated with *Salmonella* phage  $\epsilon^{15}$ . *Virology* 52: 148-159
- Török I, Kondorosi É, Stepkowski T, Pósfai J, Kondorosi Á (1984) Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Nucleic Acids Res.* 12:9509-9524
- Turgeon BG, Bauer WD (1982) Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.* 60:152-161
- Vanaman TC, Wakil SJ, Hill RL (1968) The complete amino acid sequence of the acyl carrier protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:6420-6431
- van de Wiel C, Scheres B, Franssen H, van Lierop MJ, van Lammeren A, Bisseling T (1990) The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9:1-7
- Verma DPS, Fortin MG, Stanley J, Mauro VP, Purohit S, Morrison N (1986) Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.* 7:51-61
- Vincent JM (1941) Serological properties of root-nodule bacteria I: Strains of *Rhizobium meliloti*. *Proc.Lim.Soc.N.S.W.* 66:145-154
- Westphal O, Jann K (1965) Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr.Chem.* 5:83-91
- Williams MNV, Hollingsworth RI, Brzoska PM, Signer ER (1990) *Rhizobium meliloti* chromosomal loci required for suppression of exopolysaccharide mutations by lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 172:6596-6598
- Witkowski A, Rangan VS, Randhawa ZI, Amy CM, Smith S (1991) Structural organisation of the multifunctional animal fatty acid synthase. *Eur. J. Biochem.* 198:571-579
- Yanish-Perron C, Viera J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119